

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische-Chemie und  
Pathobiochemie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Identifikation der Histon-Acetyl-Transferase Tip60 als  
Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin und  
Regulationsmechanismen von KAI1 in der Onkogenese und  
Tumorprogression**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt

Der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Tobias Siegfried Kramer**  
aus Hamburg

Datum der Promotion: 05.06.2016

# Inhalt

1	Abstrakt	6
2	Einleitung	8
2.1	Krebs und Metastasierung	8
2.2	Das Onkogen $\beta$ -Catenin	9
2.3	Die Histon-Acetyl-Transferase Tip60	12
2.4	Der Metastasierungssuppressor KAI1	15
2.5	Zielsetzung	22
3	Material	23
3.1	Chemikalien	23
3.2	Verbrauchsmaterialien	24
3.3	Molekularbiologische Materialien	25
3.4	Proteinbiochemische Materialien	25
3.5	Zellkultur	27
3.6	Reaktionskits	28
3.7	Geräte	28
4	Methoden	30
4.1	Molekularbiologische Methoden	30
4.2	Proteinbiochemische Methoden	31
4.3	Co-Immunpräzipitation (IP)	38
4.4	Zellkultur	41
5	Ergebnisse	44
5.1	Interaktion von Tip60 mit LEF-1 und $\beta$ -Catenin	44
5.2	Acetylierung von $\beta$ -Catenin	48
5.3	Nukleäre Translokation / Akkumulation von Tip60 durch Phorbolster	50
6	Diskussion	53
6.1	$\beta$ -Catenin interagiert mit der HAT Tip60	53
6.2	Tip60 beeinflusst die Acetylierung von $\beta$ -Catenin nicht	55
6.3	Nukleäre Translokation von Tip60 durch Phorbolster	57
7	Zusammenfassung	61
8	Literatur	62
9	Eidesstattliche Versicherung	72
10	Lebenslauf	74
11	Publikationsliste	76
12	Danksagung	77

## Abkürzungen

### Abkürzungen

(v/v)	Volumenanteil im Verhältnis zum Volumen
(w/v)	Gewichtsanteil im Verhältnis zum Volumen
Abb.	Abbildung
AJ	<i>adherence junctions</i>
Amp	Ampicillin
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APP	<i>amyloid-beta-precursor protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CK1 $\alpha$	Casein Kinase 1 $\alpha$
CoA	Coenzyme A
C-term.	C-terminal
Da	Dalton
dNTP	2`-Desoxynukleotid-Triphosphat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Double Strand Break
DTT	Dithiothreitol
DVL	Dishevelled
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fhit	<i>fragile histidin triad</i>
FKS	fetales Kälberserum
FZD	frizzled
GSK3 $\beta$	Glycogensynthase Kinase-3 $\beta$
GST	Glutathion-S-Transferase
h	<i>hours</i> ; Stunden
HA	Hemagglutinin
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HEK	<i>human embryonic kidney</i>

## Abkürzungen

Hint1	<i>histidine triad nucleotide-binding protein 1</i>
Ig	Immunglobulin
LNCaP	<i>lymph node carcinoma of prostate</i>
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KAI1	Kaingai 1
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
LEF-1	<i>lymphocyte enhancer factor 1</i>
LEL	<i>large extracellular loop</i>
MBP	<i>maltose binding protein</i> ; Maltosebindeprotein
Mdm2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
min	<i>minutes</i> ; Minuten
MSG	Metastasierungs-suppressoren
NF $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NR	nukleärer Rezeptor
N-term.	N-terminal
ON	Oligonukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Protein-Kinase A, <i>cAMP-dependent protein kinase</i>
PKC	Protein-Kinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
s	<i>seconds</i> ; Sekunden
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SEL	<i>small extracellular loop</i>
SW480	Zelllinie aus entdifferenziertem Adenokarzinom des Kolons
t	<i>time</i> ; Zeit

## Abkürzungen

TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TST	<i>tris-buffered saline + x%Tween20</i>
U	<i>units</i> , Einheiten
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WB	Western Blot

# 1 Abstrakt

Für die Entstehung und den Progress verschiedener Tumorentitäten ist die Regulation des kanonischen Wnt-Signaltransduktionswegs mit seinem Schlüsselprotein  $\beta$ -Catenin von zentraler Bedeutung. Insbesondere bei einem Großteil der diagnostizierten Kolonkarzinome und metastasierten Prostatakarzinome finden sich Alterationen, durch die der Abbau von  $\beta$ -Catenin fehlreguliert ist. Dies führt zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma sowie dessen Translokation in den Nukleus und infolge dessen zu einer vermehrten Transkription von Wnt-Zielgenen und/oder Hemmung der Transkription von Metastasierungssuppressoren wie dem Tetraspanin-Protein KAI1.

Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin sind somit für das Verständnis der Progression von Tumorerkrankungen von großem Interesse und ermöglichen unter Umständen Einblicke in potentielle Ansatzpunkte für neue Therapieoptionen.

In der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Histonacetyltransferase (HAT) Tip60/KAT5 ein Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin ist und wie andere HATs an dessen Core-Bereich bindet. Zudem konnte die Ausbildung eines trimären Komplexes mit dem  $\beta$ -Catenin Interaktionspartner *lymphoid enhancer factor 1* (LEF-1) nachgewiesen werden.

Tip60 ist ein zentraler Bestandteil von zellulären Regulationsmechanismen, der neben seiner Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) und der Transkriptionsregulation durch Acetylierung von Histonen vor allem durch die Interaktion mit Nicht-Histon-Proteinen entscheidenden Einfluss auf die Regulation verschiedener Tumorentitäten hat. Im Gegensatz zu anderen HATs acetyliert Tip60 den Interaktionspartner  $\beta$ -Catenin nicht.

Der Phorbolester Phorbol-12-Myristat-13-Acetate (PMA) führt zu einer nukleären Translokation von Tip60 in metastasierten Prostatakarzinomzellen und steigert die Protein-Kinase C (PKC)-vermittelte Transkription des Metastasierungssuppressors KAI1. Dies geschieht, indem ein aus  $\beta$ -Catenin und Reptin bestehender Repressorkomplex durch einen Aktivatorkomplex bestehend aus Tip60 und Pontin vom Promoter verdrängt wird, ohne dass sich die Gesamtmenge oder Lokalisation der übrigen beteiligten Proteine verändert.

## Abstract

Regulation of the canonical Wnt-signaling pathway and its core member  $\beta$ -Catenin are of great importance in oncogenesis and metastasis. Especially in colon and metastatic prostate carcinomas alterations in the cytosolic degradation of  $\beta$ -Catenin and its nuclear translocation are crucial for the effects on downstream signaling, leading to suppression of the transcription of the tetraspanin protein KAI1, which acts as a metastasis suppressor in metastatic prostate carcinoma cell lines.

Because of its central role, knowledge of regulation and of interaction partners of  $\beta$ -Catenin is of high importance for understanding of the progression of cancer and might provide information for novel therapeutic approaches.

The histone acetyltransferase (HAT) Tip60/KAT5 plays a central role in cellular regulation. Besides being crucial for DNA double strand break (DSB) repair, Tip60 can acetylate histone- and non-histone proteins. It binds to the  $\beta$ -Catenin core region, but unlike other HATs does not acetylate it. In junction with the  $\beta$ -Catenin interaction partner lymphoid enhancer factor 1 (LEF-1) they can build a ternary complex.

The phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) up-regulates transcription of KAI1 in LNCaP metastatic prostate cancer cells via recruiting a Tip60/Pontin activator complex to its proximal promoter region. These changes were not associated with differences in overall levels of Tip60, Pontin,  $\beta$ -Catenin or Reptin protein expression but with PMA-induced nuclear translocation of Tip60.

## 2 Einleitung

### 2.1 Krebs und Metastasierung

Krebserkrankungen sind in der heutigen Zeit in den westlichen Industrieländern eine der Haupttodesursachen. In den letzten Jahrzehnten war es möglich ein tieferes Verständnis über deren Entstehung und Entwicklung zu erlangen, um den Menschen der Risikopopulation eine genauere Diagnostik und effektivere Therapie anbieten zu können.

Eine Vielzahl von Faktoren begründet die Entstehung von Tumoren aus verschiedenen Zelltypen. Aber auch angeborene, genetische Besonderheiten können zur Entstehung von Tumoren beitragen, so z.B. bei der Familiären adenomatösen Polyposis, zystischen Nierenerkrankung und dem Peutz-Jeghers-Syndrom. Die Entwicklung von Metastasen eines Primärtumors gilt bis heute als finale Entwicklungsstufe einer Krebserkrankung und limitiert in vielen Fällen die Therapieoptionen und -erfolge.

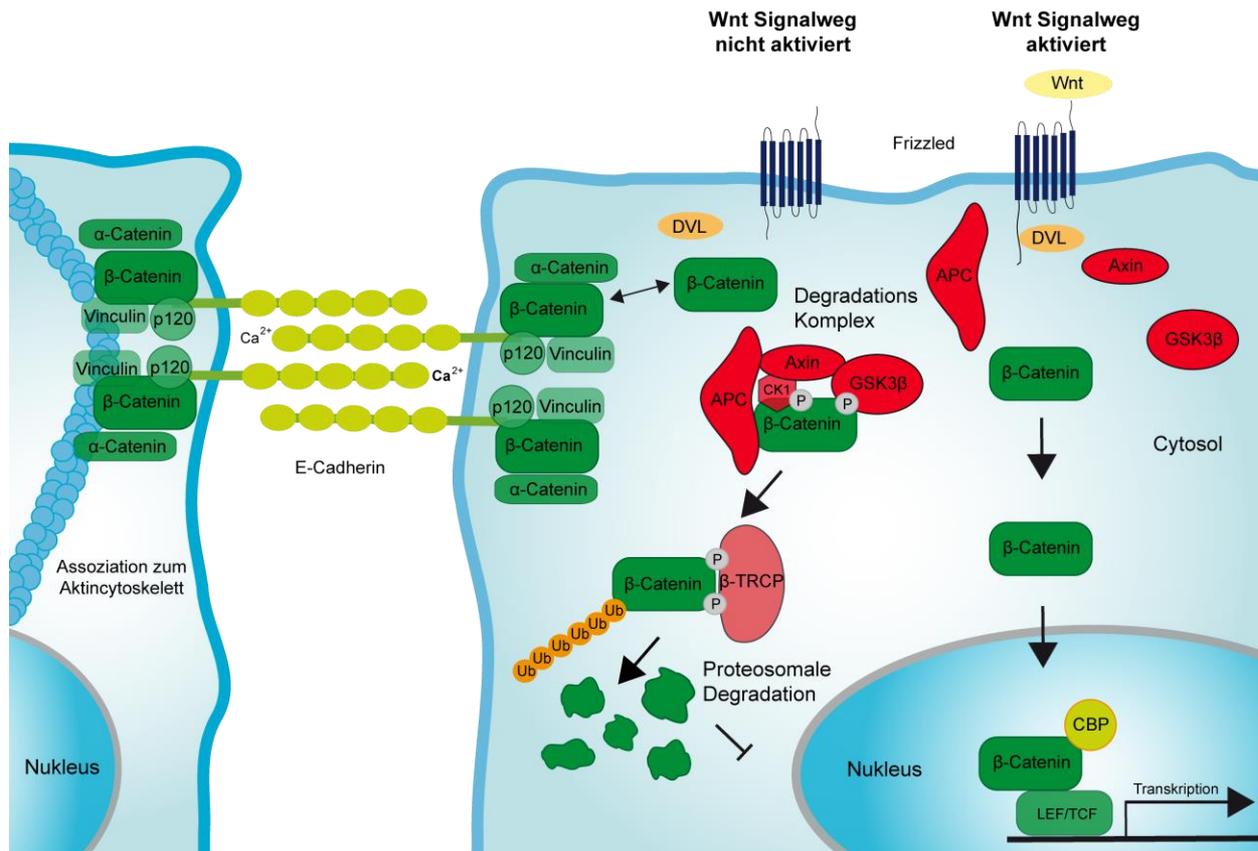
Eine Vielzahl von Onkogenen, Tumorsuppressoren, Metastasierungssuppressoren und deren Einfluss auf die Tumorenstehung und Progression wurden beschrieben. Häufig überschneiden sich die Beschreibungen von einzelnen Komponenten und Signaltransduktionswegen bei verschiedenen Tumorarten, da sie in der Zellentstehung und dem Zellhaushalt eine zentrale Rolle einnehmen. Ein Beispiel dafür ist der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg mit seinem zentralen Bestandteil  $\beta$ -Catenin. Dabei ist  $\beta$ -Catenin als Onkogen beschrieben und von großer Bedeutung für die zelluläre Entwicklung sowie Zell-Zellverbindungen. Über die letzten Jahre wurde ein weites Spektrum an Interaktionspartnern, Funktionen und Effekten für  $\beta$ -Catenin beschrieben und dadurch seine zentrale Position bestätigt. Untersuchungen auf diesem Gebiet tragen zu einem profunderen Wissen über die Zusammenhänge und den Einfluss auf die Entstehung und den Progress von Tumorerkrankungen bei.

## 2.2 Das Onkogen $\beta$ -Catenin

Die Entwicklung eines multizellulären Organismus geht mit einer Komplexität einher, die von konservierten Signalwegen, wie dem *Wnt*-Signalweg, hochgradig abhängig ist. Der Begriff *Wnt* ergab sich aus der Kombination der beiden Gene *wingless* (*Drosophila melanogaster*) und *Int1* (*mus musculus*). Diese wurden anfangs unabhängig voneinander identifiziert und später als homologe Gene beschrieben. Die *Wnt*-Proteine sind 350–400 Aminosäuren lange, palmitoylierte, extrazelluläre Signalproteine, die über Bindung an *Frizzled*-Rezeptoren den kanonischen bzw. nicht-kanonischen *Wnt*-Signalweg aktivieren können (1), (2). Die Transkriptionsaktivierung ist bei dem kanonischen *Wnt*-Signalweg abhängig von  $\beta$ -Catenin, weshalb er auch *Wnt*/ $\beta$ -Catenin-Signalweg genannt wird. Ohne die Bindung eines *Wnt*-Liganden wird  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma ständig abgebaut. Nach Aktivierung des Signalwegs durch Bindung von *Wnt*-Liganden an *Frizzled*-Rezeptoren wird dieser Abbau inhibiert.  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Cytoplasma und transloziert in den Kern, wo es zur Transkriptionsaktivierung über Bindung an TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren führt (siehe Abb.1).

Humanes  $\beta$ -Catenin wird auf Chromosom 3 durch das CTNNB1 Gen kodiert und besitzt eine molare Masse von 88 kDa. Es gehört zur Familie der Armadillo-Proteine, welche über eine oder mehrere *Armadillo-Repeat* Domänen verfügen, die hauptsächlich auf Protein-Proteinbindung spezialisiert sind. In Vertebraten finden sich weitere  $\beta$ -Catenin-Homologe: das  $\gamma$ -Catenin, auch Plakoglobin genannt und das  $\alpha$ -Catenin.

Neben der Signalfunktion im *Wnt*-Signalweg gehört  $\beta$ -Catenin zum Cadherin-Catenin-Protein-Komplex, aus welchen *adherens junctions* (AJ) gebildet werden (3). AJ übernehmen wichtige Funktionen bei der Regulation von Zelladhäsion und -wachstum sowie bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung von epithelialen Zellschichten, wie sie z.B. in Hohlorganen vorkommen.  $\beta$ -Catenin bindet an die C-terminale Domäne des transmembranären E-Cadherins und verbindet über  $\alpha$ -Catenin die Proteine mit dem Aktin-Cytoskelett (2).



**Abb. 1: Überblick über den kanonischen *Wnt*-Signalweg und die Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsionen.** Bei fehlender Stimulation durch ein *Wnt*-Signal wird der cytosolische Pool an freiem  $\beta$ -Catenin mit Hilfe eines Degradationskomplexes phosphoryliert (P), ubiquitinyliert (Ub) und durch das Proteosom abgebaut. Bei erfolgter Bindung von *Wnt* und den *Frizzled*-Rezeptor wird das Protein Dishevelled (DVL) an den Rezeptor gebunden und der Degradationskomplex zerfällt. Die Menge an  $\beta$ -Catenin im Cytosol steigt und transloziert in den Nucleus. Dort reguliert es, nach erfolgter Acetylierung durch HATs (CBP) im Zusammenspiel mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren die *Wnt*-abhängige Transkription. E-Cadherin vermittelt die Interaktion benachbarter Zellen. Cytoplasmatisch sind  $\beta$ -Catenin und weitere Proteine wie z. B.  $\alpha$ -Catenin, p120 und Vinculin mit E-Cadherin assoziiert und verbinden es mit dem Actincytoskelett (4).

Erstmalig wurde  $\beta$ -Catenin als Mediator bei der Vermittlung von Zell-Zellkontakten beschrieben (5, 6), allerdings spielt es ebenfalls im kanonischen *Wnt*-Signalweg (siehe Abb. 1) eine entscheidende Rolle (7). Bei fehlendem *Wnt*-Signal wird die Menge an cytosolisch vorliegendem  $\beta$ -Catenin zum großen Teil durch einen Degradationskomplex, bestehend aus *Adenomatous polyposis coli* (APC), Axin, Casein Kinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) und Glycogensynthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (8) phosphoryliert und somit für den Abbau durch das Proteosom markiert (9). Bei Aktivierung des *Wnt*-Signalweges kommt es durch die Bindung von *Wnt* an den *Frizzled*-Rezeptor zur Rekrutierung des Moleküls Dishevelled (DVL) zur Zellmembran, wodurch die GSK3 $\beta$  inhibiert wird. Da  $\beta$ -Catenin nicht weiter von GSK3 $\beta$  phosphoryliert wird, löst es sich vom Axin-Komplex und akkumuliert im Cytosol (10). Das stabilisierte  $\beta$ -Catenin transloziert in den Kern, um die

## Einleitung

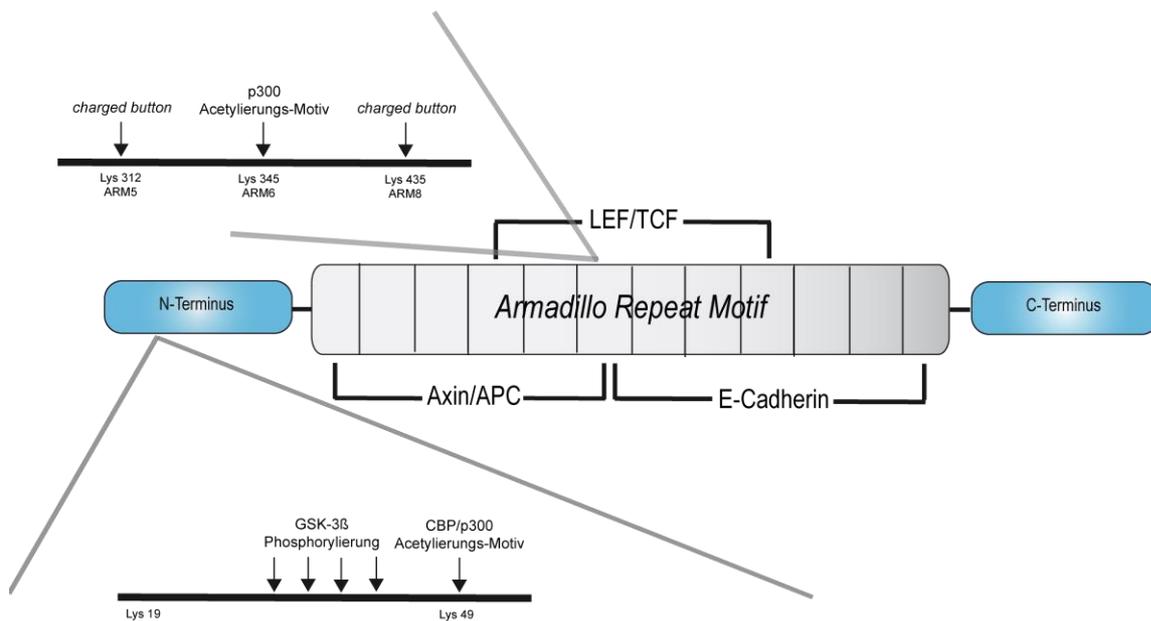
*Wnt*-abhängige Transkription zu regulieren. Dies erfolgt durch die Interaktion mit *lymphocyte enhancer factor/T-cell factor* (LEF/TCF) (11). Die Kontrolle von multiplen biologischen Prozessen einschließlich Morphogenese und Differenzierung ist die Folge (12). Als ein wichtiger Bestandteil des kanonischen *Wnt*-Signalweges hat  $\beta$ -Catenin bedeutenden Einfluss auf die Embryogenese (13), physiologische Vorgänge (14, 15), wie beispielsweise die endometriale Homeostase (16), das Wachstum quergestreifter Muskulatur (17) und die Reaktion von Osteoblasten nach mechanischer Belastung (18) sowie auf die Entstehung von Tumoren (19) und andere pathologische Prozesse (20). Dazu zählen die Entstehung vom Morbus Alzheimer (20), die Regulation von embryonalen Stammzellen (21) sowie der embryonalen Entwicklung im Allgemeinen (22).

Es konnte nachgewiesen werden, dass  $\beta$ -Catenin an der Entstehung bzw. der Metastasierung von Tumoren des Gastrointestinaltraktes, der Mamma, der Ovarien, der Prostata, der Leber, des Pankreas, der Schilddrüse sowie bei Leukämien, Lymphomen, Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen maßgeblich beteiligt ist. Eine erhöhte  $\beta$ -Catenin-Produktion ist direkt mit Basalzellkarzinomen assoziiert (23). Verschiedene Mutationen im CTNNB1-Gen, welches für  $\beta$ -Catenin kodiert, können zur Entwicklung von u.a. Kolorektal- und Ovarialtumoren, Hepatoblastomen sowie zu Medulloblastomen führen. Die wohl am besten beschriebene Assoziation von  $\beta$ -Catenin mit einer Krebserkrankung besteht bei kolorektalen Tumoren. Es hat sich gezeigt, dass in bis zu achtzig Prozent der untersuchten Fälle eine direkte oder indirekte Deregulation von  $\beta$ -Catenin beobachtet werden konnte (24, 25). Dies bezieht sich zum großen Teil auf bekannte Mutationen des APC-Gens, welche die Ursache für die Adenomatöse Polyposis sind, durch die es zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Cytosol kommt. Aber auch Mutationen des  $\beta$ -Catenin-Gens selbst können eine entscheidende Rolle spielen (20, 26, 27). Daher gilt  $\beta$ -Catenin heutzutage sowohl als wichtiges Onkogen (10) als auch als potentieller Ansatzpunkt für neue Therapieoptionen (20).

Auch abseits des *Wnt*-Signalweges sind für  $\beta$ -Catenin eine Vielzahl von Interaktionspartnern beschrieben. So lässt sich zum Beispiel der Einfluss von  $\beta$ -Catenin bei Tumoren der Prostata auf verschiedene Faktoren zurückführen. Es konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin mit dem Androgenrezeptor (AR) interagiert (28, 29) und die Zellen ihre Androgensensitivität verlieren (30). Des Weiteren interagiert  $\beta$ -Catenin mit

## Einleitung

der DNA-Helikase Reptin in einem Repressorkomplex des Metastasierungssuppressors KAI1 in metastasierten Prostatakarzinomzellen (31, 32).



**Abb. 2: Schematische Darstellung von  $\beta$ -Catenin.** Acetylierungsstellen konnten sowohl im N-Terminus (Lys49), als auch im Armadillo-Repeat-Motif 6 (Lys345) nachgewiesen werden. Lys312 und Lys435, die als *charged-buttons* bezeichnet werden, liegen im aktiven Zentrum des Proteins und sind von großer Bedeutung für die Bindung einer Vielzahl von Interaktionspartnern (33, 34).

Außer der Phosphorylierung durch GSK-3 $\beta$ , unterliegt  $\beta$ -Catenin auch der Modifikation durch andere Enzyme, wie z.B. der Protein Kinase A (PKA), die zu einem verminderten Abbau von  $\beta$ -Catenin im Cytosol führt (35).  $\beta$ -Catenin kann durch Histon-Acetyltransferasen wie z.B. CREB-binding-Protein (CBP) (33) oder p300 acetyliert (siehe Abb.2) werden. Dieses beeinflusst die Regulation der Transkription durch  $\beta$ -Catenin haben kann (34). Die genauen Funktionsmechanismen sowie weitere Acetyltransferasen, die mit  $\beta$ -Catenin interagieren, gilt es zu untersuchen, um profundere Einblicke in Tumorenstehung und Tumorbilogie zu erhalten und ggf. Ansatzpunkte für Therapien beschreiben zu können.

## 2.3 Die Histon-Acetyl-Transferase Tip60

Posttranslationale Proteinmodifikationen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von multiplen zellulären Prozessen. Zu diesen zählen DNA-Reparaturmechanismen, Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Apoptose, Proteinstabilität, Protein-Protein Interaktionen und nukleäre Translokation (36). Die Modifikation der Proteine wird durch

## Einleitung

Vorgänge wie Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, Glykosylierung, Sumoylierung und ADP-Ribosylierung erreicht. Weiterhin ist auch die Acetylierung von Histon- und Nicht-Histon-Proteinen als wichtiger Vorgang der Proteinmodifikation beschrieben worden.

Tip60, auch *human-immuno-deficiency-Virus-interacting-protein* TAT-1 (HIV TAT-1) genannt, eine 60 kDa große Histon-Acetyltransferase (HAT), ist ein Mitglied der MYST-Familie (siehe Tab. 1), die im humanen Genom auf Chromosom 11 durch das KAT5 Gen codiert wird (37). HATs erfüllen durch die Acetylierung von Histon und Nicht-Histon Proteinen wichtige Aufgaben im Bereich der Transkription, dem *Chromatin-Remodelling* und der Apoptose in verschiedenen multizellulären Organismen. Der Name MYST setzt sich aus den zuerst beschriebenen Mitgliedern: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 und Tip60 zusammen (38). Aufgrund von Strukturähnlichkeiten und vorhandenen Sequenzübereinstimmungen werden diese Proteine in einer gemeinsamen Gruppe zusammengefasst. Allerdings übernehmen sie verschiedene regulatorische Aufgaben in multizellulären Organismen (39).

MYST	Organismen	<i>In vitro</i> HAT Aktivität	<i>In vitro</i> Histon Spezifität	Native HAT Komplexe <i>in vitro</i>
Sas2	<i>Yeast</i>	ND		
Sas3	<i>Yeast</i>	Ja	<b>H3/H4/H2A</b>	NuA3c ( <b>H3</b> )
Esa1	<i>Yeast</i>	Ja	<b>H4/H3/H2A</b>	NuA4 ( <b>H4/H2A</b> )
MOF	<i>Drosophila</i>	Ja	<b>H4/H3/H2A</b>	MSL Komplex ( <b>H4</b> )
Tip60	Mensch	Ja	<b>H4/H3/H2A</b>	Tip60 Komplex
MOZ	Mensch	ND		
MORF	Mensch	Ja	<b>H4/H3/H2A</b>	
HBO1		Ja	ND	HBO1 Komplex
p300/CBP	Verschiedene Multizellulare	Ja	<b>H2A/H2B/H3/H4</b>	

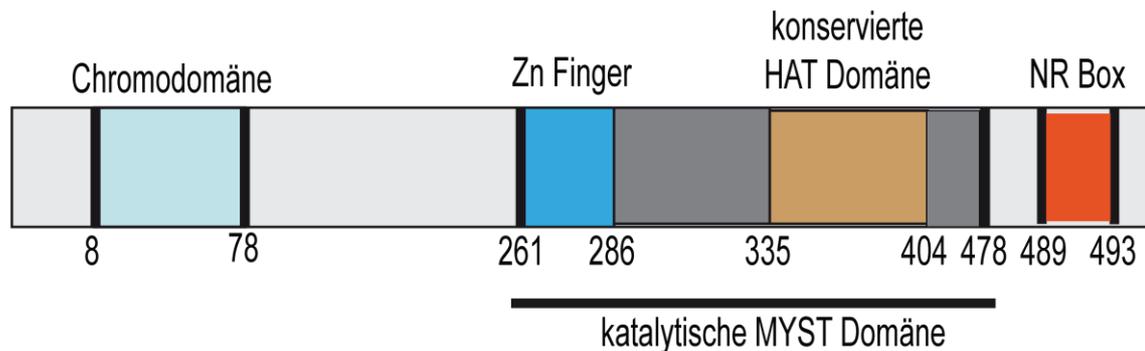
**Tab. 1: Mitglieder der MYST-Familie.** Die Histon-Acetyltransferasen sind in fast allen mehrzelligen Organismen auffindbar. Sie verfügen teilweise über eine Spezifität gegenüber bestimmten Histonen. Auch Nicht-Histon-Proteine können von Histon-Acetyltransferasen modifiziert werden (40).

Tip60 stellt hierbei das erste humane MYST-Protein dar, welches 1996 durch einen *yeast two-hybrid/human library screen* identifiziert werden konnte und eine potentielle direkte Verbindung zur Acetylierung von Histonen aufweist. Die Forschung der letzten

## Einleitung

Jahre konnte eine zentrale Rolle für Tip60 auch im Bereich von DNA-Reparaturmechanismen (41, 42), Apoptose (43) sowie Signaltransduktion (44) und das *Chromatin-Remodelling* (45) nachweisen. Es ist zu vermuten, dass es sich bei Tip60 um einen wichtigen Spieler im Bereich der Tumorgenese (46-48) handelt.

### Tip60 alpha (Isoform2)



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Proteindomänen von Tip60.** Die C-terminal gelegene katalytische MYST-Domäne ist bei allen MYSTs homolog vorhanden und enthält die konservierte HAT-Domäne, die das Acetyl-CoA bindet (49).

Drei Splicevarianten von Tip60 konnten bisher in einer Vielzahl von Zellen und Geweben gefunden werden: Tip60 Isoform 1, Tip60 Isoform 2 (Tip60 $\alpha$ ) und Tip60 Isoform 3 (Tip60 $\beta$ ) (50). Strukturell verfügt Tip60 über eine N-terminale Chromodomäne (siehe Abb.3), wie sie in vielen Proteinen, die Chromatin-Regulation betreiben, vorhanden ist. Man geht im Allgemeinen davon aus, dass diese Domäne die Interaktion mit methylierten Lys-Resten und RNA-Molekülen vermittelt (51), allerdings konnte dies für Tip60 bisher nicht nachgewiesen werden. Die C-terminal konservierte MYST-Domäne besteht aus einer relativ kurzen konservierten HAT-Domäne (Aminosäuren 335-404), welche das benötigte Acetyl-CoA und das Substrat bindet. Dabei wird ein Lysin-Rest des Substrats durch das Glu403 des Tip60 deprotoniert. Am Cys369 wird mit der Acetylgruppe des CoA ein Enzyme-Acetyl-Ester gebildet („Ping-Pong-Mechanismus“), wobei der Acetylrest auf das zuvor deprotonierte Lysin übertragen wird (52). Weiterhin befindet sich N-terminal zur HAT-Domäne in Tip60 ein Cys-Cys-His-Cys Zinkfinger, der sowohl für die Enzymaktivität als auch für Protein-Protein-Interaktion von großer Bedeutung ist (53, 54). Am äußersten C-terminalen Ende wurde eine kurze *Nuclear-Receptor* (NR)-Interaktionsbox identifiziert (55), die wichtig für die Interaktion mit dem Androgenrezeptor ist (46) .

## Einleitung

Tip60 besitzt eine relativ kurze Halbwertszeit von 30–90 Minuten, da es normalerweise über Polyubiquitinylierung durch Mdm2 proteosomal direkt abgebaut wird (56). Im Falle einer DNA-Schädigung wird Tip60 jedoch stabilisiert (41). Zusätzlich kann eine Phosphorylierung von Tip60 an Serine 86 und 90 durch Cdc2 entscheidend dessen katalytische Fähigkeit beeinflussen (57). Des Weiteren ist auch eine Acetylierung an Lys268 und Lys282 durch andere HATs wie p300 und CREB beschrieben (58), deren Bedeutung jedoch ungeklärt ist.

Neben dem *DNA-Damage-Response* (DDR) (59, 60), Apoptose (61), Mitose (62) und der p53-Signaltransduktion (63) konnte auch die Beteiligung von Tip60 an anderen Regulationsvorgängen wie z.B. von nukleären Rezeptoren (NR) (55), Myc (45), *Amyloid-beta-Precursor Protein* (APP) (64) und NF-kappaB (65) nachgewiesen werden. Diese Diversität an unterschiedlichsten Interaktionspartnern, spiegelt die zelluläre Bedeutung von Tip60 wieder.

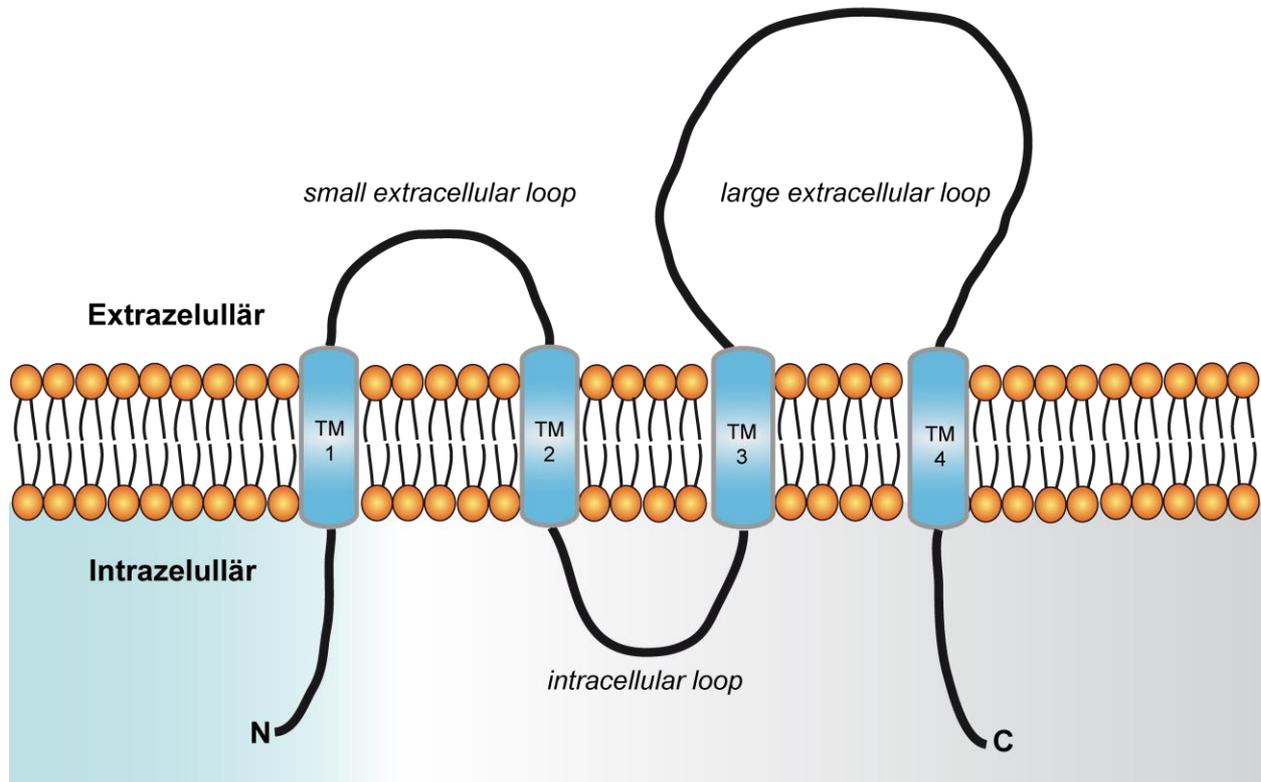
## 2.4 Der Metastasierungssuppressor KAI1

Metastasierungssuppressor-Gene (MSG) sind über ihre Fähigkeit definiert, Metastasenentstehung und -wachstum zu inhibieren, ohne dabei das Wachstum des primären Tumors zu beeinflussen (66). Bisher konnten *in vivo* zwanzig verschiedene Gene der Klasse der MSG zugeordnet werden. Die entsprechenden Proteine sind an einer Vielzahl von unterschiedlichen Signalkaskaden beteiligt (67), die eine mögliche Metastasierung des Tumors unterdrücken (68).

Bei KAI1 (Cluster of differentiation, CD82) handelt es sich um ein Metastasierungssuppressor-Gen, dessen Genprodukt ein Glykoprotein ist, welches zur Familie der Tetraspanine zählt. Tetraspanine, auch Tetraspans genannt, sind ein Teil der Transmembrane-4-Superfamilie und gehören zur Gruppe der Typ III Membranproteine, die ubiquitär in allen multizellulären Lebewesen vorhanden sind (68, 69). Bei Säugetieren wurden bisher 34 verschiedene Tetraspanine beschrieben, von denen 33 im menschlichen Organismus identifiziert werden konnten. Die Aufgaben dieser Proteine sind vielfältig und umfassen biologische Vorgänge wie die Bildung von Synapsen, neuronales Wachstum oder die Fusion von Oocyte und Spermium. Somit regulieren diese Proteine Zelladhäsion, -migration, -fusion und -proliferation (70, 71).

## Einleitung

Obwohl die genauen Regulationsmechanismen weitestgehend unbekannt sind, lässt sich insbesondere ihr Einfluß auf die Zellmotilität anhand bestimmter Tetraspanine hervorheben (72). So inhibiert KAI1 die Zellmotilität (73), während das Tetraspanin CD151 sie katalysiert (74).



**Abb. 4: Schematischer Aufbau von Tetraspaninen.** Tetraspanine bestehen aus 4 Transmembrandomänen, einem kleinen *intrazellulären Loop* (4 AS), der von den relativ kurzen cytoplasmatischen N- und C-Termini (8-21AS) flankiert wird. Extrazellulär befinden sich eine kleine (*small-extracellular-loop*) und eine große Schleife (*large-extracellular-loop*). Diese lässt sich in eine konstante Region (die aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist) und eine variable Region (die der Protein-Protein-Interaktion dient) aufteilen (75).

In Abb. 4 ist sichtbar, dass Tetraspanine aus vier Transmembrandomänen (TM), intrazellulär lokalisierten N- und C-Termini, sowie aus zwei extrazellulären Domänen bestehen. Diese gliedern sich in einen *large extracellular loop* (LEL) und einen *small extracellular loop* (SEL) (75). Innerhalb der Mitglieder der Tetraspaninfamilie, teilt der LEL deutlich weniger Homologien, als dies bei den transmembranären und intrazellulären Domänen der Tetraspanine der Fall ist (72). Es lässt sich eine Aufteilung des LEL in konstante Bereiche und in einen variablen Bereich vornehmen. Die konstanten Bereiche, die sich am N- und C-terminalen Abschnitt des LEL befinden, vermitteln eine Dimerisierung der Tetraspanine untereinander (76). Der variable Bereich, der die heterogene Protein-Protein-Bindung vermittelt, ist hingegen zentral im

## Einleitung

LEL lokalisiert (77). Bei KAI1 besteht der variable Bereich des LEL aus sechs stark konservierten Cysteinen, die für die Ausbildung von Disulfidbrücken und somit für die korrekte Faltung des LEL von großer Bedeutung sind. Des Weiteren liegen in diesem Bereich drei potentielle *N*-Glykosylierungsstellen vor.

Über die Funktion des SEL bei KAI1 ist bisher wenig bekannt. Es wird jedoch postuliert, dass der SEL eine ähnliche Funktion einnimmt, wie bei dem gut untersuchten Tetraspanin CD8, bei dem der SEL die korrekte Faltung des LEL beeinflusst (78). Bei den Transmembrandomänen handelt es sich um hochgradig evolutionär konservierte Bereiche, deren hydrophobe Interaktionen von großer Bedeutung für die Ausbildung und den Erhalt der sogenannten Tetraspanin-Netze sind (79). Zusätzlich haben Untersuchungen gezeigt, dass sowohl bei KAI1 als auch bei anderen Tetraspaninen die Transmembrandomänen 1, 3 und 4 über polare Aminosäuren (Asparagin, Glutamin, Glutaminsäure) verfügen, die sich weitestgehend am intertransmembranären Bereich befinden (80). Diese Aminosäuren fungieren als Wasserstoffdonor bzw. -akzeptor und vermitteln so vermeintlich die Dimerisierung oder Polymerisierung von Tetraspaninen (81). Des Weiteren deuten bisherige Ergebnisse darauf hin, dass Transmembrandomänen (TM) im Allgemeinen und die Transmembrandomäne 1 im Speziellen für die Reifung und den Transport des KAI1-Moleküls von Bedeutung sind. Die intrazelluläre Schleife von KAI1 besteht aus 4–5 Aminosäuren. Ähnlich wie bei anderen Tetraspaninen, erfolgt auch hier eine Palmitoylierung der cytosol- und TM-nahen Cysteine. Der cytoplasmatische N-Terminus umfasst 11 Aminosäuren (AS) und der C-Terminus 15 AS. Ähnlich der intrazellulären Schleife werden auch hier die TM-nahen Cysteine palmitoyliert (82). Am N-terminalen Ende finden sich die stark konservierten Lysine 10 und 11, deren Bedeutung aber für KAI1 bisher nicht geklärt werden konnte.

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Expression von KAI1 bei verschiedenen fortgeschrittenen Krebserkrankungen des Menschen herunterreguliert ist (siehe Tab. 2) (83-85).

Tumor Typ	Bedeutung von KAI1
Prostatakarzinom	Reduzierte Mengen in Tumorzellen
Mammakarzinom	Keine klinische Korrelation beschrieben, evtl. Rolle bei Progress mit Hirnmetastasen
Bronchialkarzinom	Korrelation mit anderen Markern; evtl. Prognostischer Marker
Pankreaskarzinom	Positive Expression führt zur erhöhten Überlebensrate
Urothelkarzinom	Herunterregulation führt zum Progress
Nasopharyngeales Plattenepithelkarzinom	Vermindert in 73% der beobachteten Fälle
Larynxkarzinom	Direkte Verknüpfung von Expression zu TNM-Stadium
Gallenblasenkarzinom	Korreliert invers mit dem Stadium des Tumors
Schilddrüsenkarzinom	Verminderte Mengen in Metastasen
Neuroblastom	Verminderte Expression in frühen Stadien
Tumoren des oberen GI-Trakts	Herunterreguliert; potentiell prognostischer Marker bei Plattenepithelkarzinomen des Magens
Ovarialkarzinom	Direkte Verknüpfung zu Tumorstadium
Cervixkarzinom	Involviert in die frühe Karzinogenese
Endometriales Karzinom	Potentieller Prognostischer Marker
Plattenepithelkarzinom des Penis	Korreliert invers mit Stadium und Überlebensrate

**Tab. 2: Klinische Bedeutung von KAI1 für verschiedene Tumoren (86).**

Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* haben ergeben, dass der Verlust der KAI1-Expression in direkter Verbindung mit einer Reduktion der Zelladhäsion, einer gesteigerten Zellmigration sowie mit einer veränderten Bindungsfähigkeit für extrazelluläre Proteine, wie z.B. Fibronectin, einhergeht (85, 87). Hieraus folgt als Konsequenz für die Tumorzellen *in vitro* ein gesteigertes invasives Wachstum (88, 89) und *in vivo* eine erhöhte Metastasierungsrate (89). Dies deutet darauf hin, dass KAI1 bei der Metastasierung von Tumoren eine wichtige Rolle zukommt. Es sind allerdings

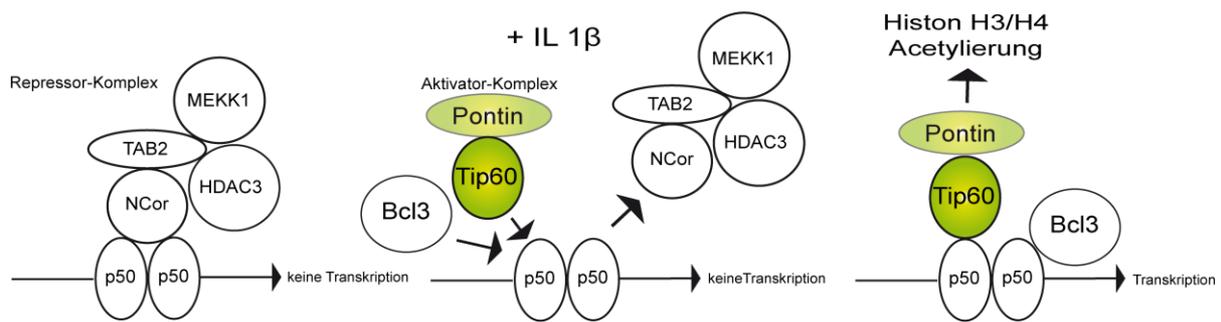
## Einleitung

erst wenige Informationen über die Regulationsmechanismen der KAI1-Expression bekannt. Eine verminderte Expression resultiert weder aus einem Verlust von Allelen (90-92), Mutationen im kodierenden Bereich des Gens (91, 93) noch aus einer Hypermethylierung der Promoterregion (94). Wahrscheinlicher hingegen ist die Steuerung durch die erhöhte Aktivität eines Repressor bzw. verminderte Aktivität eines Aktivators (95).

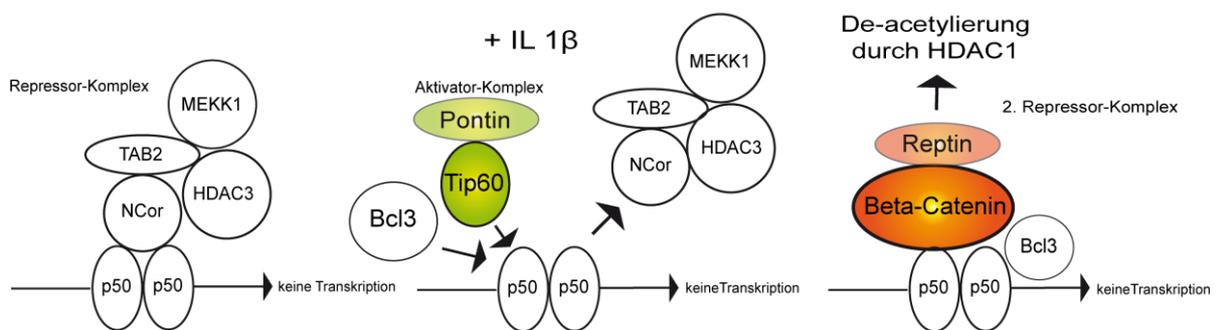
Im Promoter von *kai1* sind weder typische TATA- noch CAAT-Motive vorhanden. Es finden sich jedoch Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren p53, AP-1, AP-2 und SP1 (96). Für p53, das bei multiplen Tumorerkrankungen in mutierter Form vorliegt, konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* als auch *in vivo* an den KAI1-Promoter binden kann (-197 bis -1bp, +1 bis +351). Nach Bindung von p53 an den Promoter erfolgt die Expression von KAI1 (97). Jedoch konnte weiterhin eine Expression von KAI1 in Zellen nachgewiesen werden, in denen die DNA-Bindung von p53 durch Mutation inhibiert wurde (98). Es konnte gezeigt werden, dass die NFkappaB Untereinheit p50 an die Region 6631 bis 6996bp *upstream* vom KAI1-Startbereich bindet. In diesem Bereich befinden sich NFkappaB-homologe Bindungssequenzen (65, 99). Die Überexpression und Aktivierung von NFkappaB steigert sowohl die nachweisbaren Mengen mRNA, als auch die Proteinmengen von KAI1 in murinen und humanen Zelllinien (100). Die spezifische Inhibition von Protein Kinase C (PKC) führt dagegen zu einer verminderten Expression von KAI1 (101). Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei NFkappaB um einen zentralen Bestandteil für die Regulation von KAI1 handelt, dessen Auswirkungen abhängig davon sind, ob es als Transkriptions-Co-Faktor einen Aktivator-Komplex, bestehend aus z.B. Tip60/Fe65, oder einen Repressor-Komplex aus N-CoR/TAB2/HDAC3 bindet (65, 102).

## Einleitung

### Nicht metastasierte Zellen



### metastasierte Zellen



**Abb. 5: Schematisches Model des *recruitments* der Transkriptionkomplexe in Prostata tumorzellen.** Nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  wird in nicht-metastasierten Zellen der Repressor-Komplex durch den Aktivator-Komplex verdrängt, es kommt zur Acetylierung von Histonen und KAI1 wird transkribiert. Bei metastasierenden Zellen hingegen erfolgt nach Stimulation die Blockade der Transkription durch einen zweiten Repressor-Komplex, der zur Deacetylierung der Histone führt (103, 104).

Es konnte gezeigt werden, dass Interleukin (IL)-1 und Tumornekrosefaktor (TNF) die Genexpression von KAI1 induzieren (siehe Abb.5) (100). Daher könnten, neben NFκappaB, auch weitere Transkriptionsfaktoren aus den IL-1- und TNF-Signaltransduktionswegen eine wichtige Rolle für die Regulation von KAI1 spielen. Des Weiteren konnte die Transkription und Expression von KAI1 durch aktiviertes PKC nachgewiesen werden. Dies erlaubt die Überlegung, dass eventuell die Faktoren, die bei der Aktivierung von PKC eine Rolle spielen, ebenfalls bei der Expression von KAI1 direkt oder zumindest indirekt involviert sind (105, 106).

Anhand nicht-metastasierter Prostatakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass der Co-Repressor-Komplex bestehend aus N-CoR/TAB2/HDAC3/MekK1, das am NFκappaB-Element gebundene p50 bindet. Durch die anschließende Deacetylierung der Histone 3 und 4, kommt es zu einer Inhibition der Transkription von KAI1. Dieser Co-Repressor-Komplex wird jedoch nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  durch den Co-Aktivator-

## Einleitung

Komplex, bestehend aus Tip60/Pontin, verdrängt. Tip60 acetyliert nun Histone 3 und 4 und die Transkription für KAI1 wird aktiviert.

Bei metastasierten Prostata-Karzinomzellen wird der Co-Aktivator-Komplex von einem zweiten Repressor-Komplex bestehend aus  $\beta$ -Catenin/Reptin verdrängt. Hierbei wird die Histondeacetylase1 durch Reptin rekrutiert und somit die Transkription von KAI1 verhindert (104), wodurch Metastasierungsprozesse propagiert werden könnten (107). Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von metastasierten Prostata-Karzinomzellen mit Phorbolester zu einer Verdrängung des  $\beta$ -Catenin/Reptin-Repressor-Komplexes durch den Tip60/Pontin-Aktivator-Komplex führt. Dies ermöglicht die Bindung von NFkappaB-p50 in der proximalen Promoterregion, wodurch die Transkription des Metastasierungssuppressors KAI1 aktiviert wird (103).

## 2.5 Zielsetzung

Tumorentstehung und Metastasierungsprozesse nehmen als pathologische Prozesse im Menschen eine zentrale Rolle ein. Der Einfluss von Histonacetyltransferasen wie Tip60, die Regulation von  $\beta$ -Catenin als Onkogen und KAI1 als Metastasierungssuppressor sind für das Verständnis der Entstehung und Progression einer Vielzahl von Krebserkrankungen von großer Bedeutung.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen einen erheblichen Einfluss auf  $\beta$ -Catenin haben. So wurde berichtet, dass sie die Interaktion mit anderen Proteinen und die intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin beeinflussen. Weiterhin ist bekannt, dass einige Histon-Acetyltransferasen in der Lage sind  $\beta$ -Catenin zu acetylieren und dadurch die Transkription von Zielgenen direkt zu beeinflussen.

KAI1 gehört zur Gruppe der Metastasierungssuppressoren und wurde in Voruntersuchungen, wie auch  $\beta$ -Catenin, bereits als wichtiger Baustein für die Regulation des Progresses von Prostatakarzinomen beschrieben. Molekulare Mechanismen der Regulation wurden bisher nur unvollständig beschrieben. Die Beteiligung von  $\beta$ -Catenin in einem Repressor-Komplex (Inhibition der Transkription von KAI1 in metastasierten Tumorzellen der Prostata) und auch die Beteiligung von Tip60 im Aktivator-Komplex von KAI1 konnten nachgewiesen werden.

Das Ziel dieser Arbeit war eine mögliche Interaktion von  $\beta$ -Catenin durch Tip60 zu analysieren und die Rolle von Tip60 bei der Regulation von KAI1 weitergehend zu untersuchen. Zunächst sollte eine mögliche Interaktion zwischen  $\beta$ -Catenin, LEF-1 und Tip60 in eukaryotischen Zellen untersucht und mit Hilfe von *in vitro*-Assoziationsstudien die Bindung der Proteine charakterisiert und mögliche Bindungsstellen analysiert werden. Es sollte der Einfluss von Tip60 auf die endogene Acetylierung von  $\beta$ -Catenin in verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Um Tip60 in Bezug auf die Regulation des Metastasensuppressors KAI1 weiter zu untersuchen und um einen potentiellen Einfluss auf Metastisierungsprozesse in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen zu identifizieren, sollten Untersuchungen mit dem Tumor-Promoter Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA) durchgeführt werden.

## 3 Material

### 3.1 Chemikalien

- Acrylamid, Rotiphorese® GEL 30, 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
- Adenosin-5`-triphosphat, ATP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Agar (Merck, Darmstadt)
- Agarose, ultra pure (Invitrogen, Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat; (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Ampicillin, Natriumsalz (Roth, Karlsruhe)
- Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, USA)
- Bromphenolblau (SERVA, Heidelberg)
- BSA Fraktion V (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Chloroform (Roth, Karlsruhe)
- Collagen A (Biochrom AG, Berlin)
- Complete™-EDTA (Roche Applied Science, Mannheim)
- Complete™-EDTA free (Roche Applied Science, Mannheim)
- Coomassie® Brilliant Blue R250 (Merck, Darmstadt)
- DAPI (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Desoxycholsäure Natriumsalz (Roth, Karlsruhe)
- dNTP's PCR-Grade (Roche Applied Systems, Mannheim)
- DTT (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- EDTA (Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Glutathion Agarose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Glutathion, reduzierte Form (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Harnstoff (Roth, Karlsruhe)
- Imidazol (Merck, Darmstadt)
- Isopropylthiogalactosid; IPTG (AppliChem, Darmstadt)
- Kanamycindisulfat (Merck, Darmstadt)
- Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Applied Science, Mannheim)

## Material

- NAMP100V; Amplify (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Natriumfluorid (Merck, Darmstadt)
- Natriummolybdat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- Natriummonovanadat (Merck, Darmstadt)
- Nickel-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden)
- Nonidet P40, NP40 (Roche Applied Systems, Mannheim)
- Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (Calbiochem, San Diego, CA)
- Polyethylenglycol; PEG (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- ProTaq Mount Fluor (Biocyc GmbH&Co.KG, Luckenwalde)
- Protein-A-Sepharose™ CL-4B (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Sodiumdodecylsulfat; SDS (Merck, Darmstadt)
- TEMED (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Tris-Base (Merck, Darmstadt)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Ziegenserum (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Alle Weiteren, nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) sowie Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

## 3.2 Verbrauchsmaterialien

- Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Millipore, Eschborn)
- Deckgläser (Menzel-Gläser, Braunschweig)
- Dialyseschläuche, Viskin, Ausschlussgröße 10 kDa (Roth, Karlsruhe)
- Filterpapier Whatman® 3MM (Biometra, Göttingen)
- Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Mikrotiterplatten, MaxiSorbU16 Module (Nunc, Wiesbaden)
- Multiwell™-Zellkulturplatten, 6-Well (Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg)

## Material

- PolyScreen®, PVDF (Polyvinylidenfluorid) Transfer Membrane (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- Röntgenfilm, Biomax MR (Kodak, Stuttgart)
- Sterilfilter Minisart®, Porengröße 0,2 µm (Sartorius, Göttingen)
- Ultrafree®-MC Zentrifugationsfilter, 5000 NMWL (Millipore, Eschborn)
- Zellschaber (Corning Incorporated, NY, USA)

Sterile Einwegmaterialien wurden von Becton-Dickinson (Heidelberg), Greiner Labortechnik (Frickenhausen) oder Nunc (Wiesbaden) bezogen.

## 3.3 Molekularbiologische Materialien

### 3.3.1 Bakterienstämme

Übersicht der verwendeten Bakterienstämme in Tabelle 3:

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue	supE44, hsdR17, recA1, end A1, gyrA46, thi, relA1, lacF <sup>+</sup> [proAB+, lacIq, lacZΔM15, Tn10 (tetr)]
<i>E. coli</i> BL21 DE3	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>E. coli</i> BL21 RE4	<i>E. coli</i> BL21 mit pREP4 transfiziert

Tab. 3

## 3.4 Proteinbiochemische Materialien

### 3.4.1 Molekulargewichtsstandards

- 1 kB Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
- 100 bp Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder, SMO671 (Fermentas, St.-Leon-Rot)
- PageRuler™ Unstained Protein Ladder; SMO431 (Fermentas, St.-Leon-Rot)

### 3.4.2 Antikörper

Antikörper	Typ	WB	IP	Referenz
Anti-Acetyl-Lysin	Maus, monoklonal	1:1000	2 µg	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
anti-β-Actin	Maus, monoklonal	1 µg/ml		Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-β-Catenin	Maus, monoklonal	0,5 µg/ml		BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
anti-β-Catenin	Kaninchen, polyklonal		2 µg	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
anti-FLAG-M2	Maus, monoklonal	0,5 µg/ml	2 µg	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-GAPDH	Maus, monoklonal	1:1000		Milipore (Darmstadt)
anti-GST	Kaninchen, polyklonal	0,5 µg/ml		J. Wienands, Universität Bielefeld
anti-HA (6E2)	Maus, monoklonal	1:1000		Cell signaling (Danvers, MA)
anti-MBP	Maus, monoklonal	0,5 µg/ml		Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-myc (9E10)	Maus, monoklonal	1,3 µg/ml		B. Kosel, gereinigt aus Hybridoma-ÜS
anti-Pontin (5G3-11)	Maus, monoklonal	1:1000		O. Huber, Universitätsklinikum Jena
anti-Reptin (L12-E)	Meerschweinchen, monoklonal	1:1000		O. Huber, Universitätsklinikum Jena
anti-Tip60	Kaninchen, polyklonal	1:1000		Upstate (Charlottesville, CA)

**Tab. 4: Übersicht der für Western Blots (WB) und Immunpräzipitation (IP) eingesetzten Antikörper.**

## **Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*; HRP)-konjugierte Antikörper**

### **(Sekundärantikörper):**

- Anti-Maus IgG aus der Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')<sub>2</sub> Fragment; 1:10.000 Verdünnung (Dianova, Hamburg)
- Anti-Kaninchen IgG (H+L) aus der Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')<sub>2</sub> Fragment; 1:10.000 Verdünnung (Dianova, Hamburg)

### **3.4.3 Enzyme**

- Benzonase (Merck, Darmstadt)

## **3.5 Zellkultur**

### **3.5.1 Medien und Lösungen**

- DMEM High Glucose (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- FKS (Biochrom KG Seromed®, Berlin)
- G418 Sulfat, Geneticin (Biochrom KG Seromed®, Berlin)
- MEM (Minimal Essential Medium Eagle) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)
- SMEM (GIBCO BRL/Life Technologies., Inc., Gaithersburg, MD, USA)
- PBS Dulbecco's (0,9 mM Ca<sup>2+</sup>, 0,5 mM Mg<sup>2+</sup>) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- PBS Dulbecco's w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Penicillin/Streptomycin 100 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Trypsin-EDTA; 0,25 % (Invitrogen, Karlsruhe)

### **3.5.2 Eukaryontische Zelllinien**

- LnCaP humane Prostataadenokarzinomzellen
- HEK-293 humane embryonale Nierenzellen
- SW480 humane Kolonadenokarzinomzellen

## 3.6 Reaktionskits

- ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing V.1.1 Reaction Kit (Applied Biosystems/ Perkin Elmer, Weiterstadt)
- BCA-Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Weiskirchen)
- Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Applied Science, Mannheim)
- Nuclei EZ Prep (Sigma, Deisenhofen, Germany)
- NucleoSEQ® Kit (Macherey-Nagel, Düren)

## 3.7 Geräte

### 3.7.1 Zentrifugen

- Kühlzentrifuge Sorvall Evolution RC Superspeed mit GSA-, GSR und SS34-Rotoren (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Tischzentrifuge 5417C und 5417R, gekühlt (Eppendorf, Hamburg)
- Zentrifuge Megafuge 2.0R, gekühlt (Kendro, Langenselbold)
- Vakuumzentrifuge Centrivac (Heraeus-Christ, Hanau)

### 3.7.2 Elektrophorese und Western Blot

- Elektrophorese-Apparatur Dual Vertical Mini Gel (C.B.S., Del Mar, CA., USA)
- Fusion-FX7 (Peqlab, Erlangen)
- Gelrockner 583 (Bio-Rad, München)
- Netzgerät Power Pac 300 (Bio-Rad, München)
- Netzgerät Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
- PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter (Peqlab, Erlangen)
- Semi-Dry Transfer Cell Trans Blot SD (Bio-Rad, München)

### 3.7.3 Bakterien und Zellkultur

- Begasungsbrutschrank Function Line (Heraeus-Christ, Hanau)
- Branson Sonifier Ultraschall (Ultraschall & Labortechnik, Schwäbisch Gmünd)
- Brutschrank Function Line (Heraeus-Christ, Hanau)
- Dr. Lange Universal-Thermostat Wasserbad (Lange, Berlin)
- Incubator Shaker C25KC (New Brunswick Scientific Edison, SJ, USA)
- Lichtmikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Oberkochen)
- Mikroskop Axioplan (Zeiss, Oberkochen)
- Nicool LM10 (Air Liquide, Marné la Valle, F)
- Sterile Werkbank Hera Safe HS12 (Heraeus-Christ, Hanau)
- Varioklav® Dampfsterilisator (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Warmluft-Rundschüttler HT (Infors AG, Bottmingen, CH)

### 3.7.4 Sonstige Geräte

- DNA-Sequenzierer ABI Prism™ Genetic Analyzer 310 (PE Applied Biosystems, Langen)
- Film-Entwicklereinheit Optimax TR (MS Laborgeräte, Heidelberg)
- Geltrockner Model 583 (Bio-Rad, München)
- Gene Amp PCR-System 2400 (PE Applied Biosystems, Langen)
- Heizblock QBT (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- Luminometer Lumat LB9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad)
- MS1 Minishaker (IKA-Labortechnik, Staufen)
- MultiCal® pH526 pH-Meter (WTW, Weilheim)
- Multiplate Reader SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- Nanodrop ND-1000 (PeqLab, Erlangen)
- Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Ultraschallprozessor UP50H (Hielscher Ultrasonics, Teltow)
- UV-Spektrophotometer DU640 (Beckman Instruments GmbH, München)

## 4 Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Hitzeschock-Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen

LB-Medium: 1 % (w/v) Bacto-Trypton, 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract, 86 mM NaCl

LB-Amp-Agar: 1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin

LB-Amp/Kana-Agar: 1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin, 25 µg/µl Kanamycin

Die Hitzeschock-Transformation ist die gebräuchlichste Methode zur Aufnahme von Plasmid-DNA in kompetenten Bakterienzellen (108). Bei der Transformation von Plasmid-DNA aus Mini- oder Midi-Präparationen (siehe 4.1.2) werden 200-500 ng Plasmid in 40 µl kompetente Zellen transformiert. Die Hitzeschock-Transformation erfolgt für 1 min (XL1-Blue) bzw. 2 min für die *E. coli* Stämme BL21 (DE3) und BL21 (RE4). Es werden je 35 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

#### 4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

LB-Amp-Medium: 1 % (w/v) Bacto-Tryptone, 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract, 86 mM NaCl, 50 µg/ml Ampicillin

P1-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 µg/ml RNase A, 10 mM EDTA

P2-Puffer: 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

P3-Puffer: 3 M Kaliumacetat; pH 5,5

TE-Puffer: 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

Die Vervielfältigung von Plasmid-DNA erfolgt durch die Transformation in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue. Mit einem Einzelklon transformierte Bakterien wurden mit 2 ml (Mini-) oder 75 ml (Midi-Präparation) LB-Amp-Medium angeimpft und für 16–18 Stunden bei 37°C kultiviert. Bei der Mini-Aufreinigung werden Bakterien durch Zentrifugation bei 2.700 × g für 5 min sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Nach wiederholter Zentrifugation wird der Überstand quantitativ entfernt und das erhaltene Pellet in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 150 µl Puffer P2 werden die Bakterien lysiert. Die anschließende Zugabe von 150 µl Puffer P3 führt zur Präzipitation von Proteinen und der genomischen DNA, die bei 20.800 × g für 10 min bei 4°C

## Methoden

abzentrifugiert werden. Der Überstand wird mit 900 µl Ethanol (−20°C) versetzt und die DNA durch Zentrifugation (20.800 × g, 4°C, 10 min) präzipitiert. Das Pellet wird mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei 40°C getrocknet und anschließend in 10–20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Aufreinigung von bis zu 100 µg Plasmid-DNA (Midi-Präp.) erfolgt mit dem Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Aufnahme der isolierten Plasmid-DNA erfolgt in 50 µl TE-Puffer und die enthaltene DNA Konzentration wird am NanoDrop bestimmt.

## 4.2 Proteinbiochemische Methoden

### 4.2.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Laufpuffer:	24,8 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,01 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 6,8
2× SDS-Probenpuffer:	65 mM Tris/HCl, pH 6,8, 3 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycin, 5 % (w/v) 2-Mercaptoethanol, 4 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Pyronin G

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt unter denaturierenden Bedingungen in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Das eingesetzte anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an Protein im Verhältnis von 1,4 zu 1 und überdeckt dabei dessen Eigenladung. Die entstehende negative Netto-Ladung auf der Oberfläche des Proteins ist proportional zur Zahl der Aminosäuren und ermöglicht so annähernd eine Auftrennung entsprechend der molaren Masse. Die Auftrennung erfolgt in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE (109) in einem vertikalen System der Firma C.B.S mit Gelen der Größe 80 × 85 × 0,75 mm. Das Sammelgel (ca. 15 mm Höhe) enthielt eine Acrylamidkonzentration von 4,5 % (w/v), die Konzentration des Trenngels (ca. 60 mm) wird nach Größe der aufzutrennenden Proteine zwischen 10 und 14 % (w/v) gewählt.

## Methoden

Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für zwei 0,75 mm dicke Gele sind in Tabelle 5 dargestellt:

Komponent	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	10 %	14 %	4,5 %
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
Sammelgelpuffer	-	-	-	0,5 ml
Acrylamid	2,5 ml	3,3 ml	4,7 ml	0,83 ml
H <sub>2</sub> O	4,6 ml	3,77 ml	2,7 ml	0,83 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	33,3 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	33,3 µl
TEMED	13,4 µl	13,4 µl	13,4 µl	6,7 µl

**Tab. 5**

Die aufzutrennenden Proben werden im Verhältnis 1:2 mit 2× SDS-Probenpuffer verdünnt und für ca. 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von 60 V im Sammelgel bzw. 120–200 V nach Einlaufen der Lauffront in das Trenngel.

### 4.2.2 Proteinfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie

#### Brilliant Blue

Blue R-250 Färbelösung: 30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Ethanol, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Essigsäure (96 %), 40 % (v/v) Ethanol

Es ist möglich, Proteine in Polyacrylamid-Gelen mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 anzufärben. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an Proteine und färbt diese blau. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,5 µg Protein pro Bande. Die SDS-Gele wurden für 5–10 min bei Raumtemperatur in der Färbelösung inkubiert und anschließend bis zu einem optimalen Signal/Hintergrund-Verhältnis entfärbt.

### 4.2.3 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

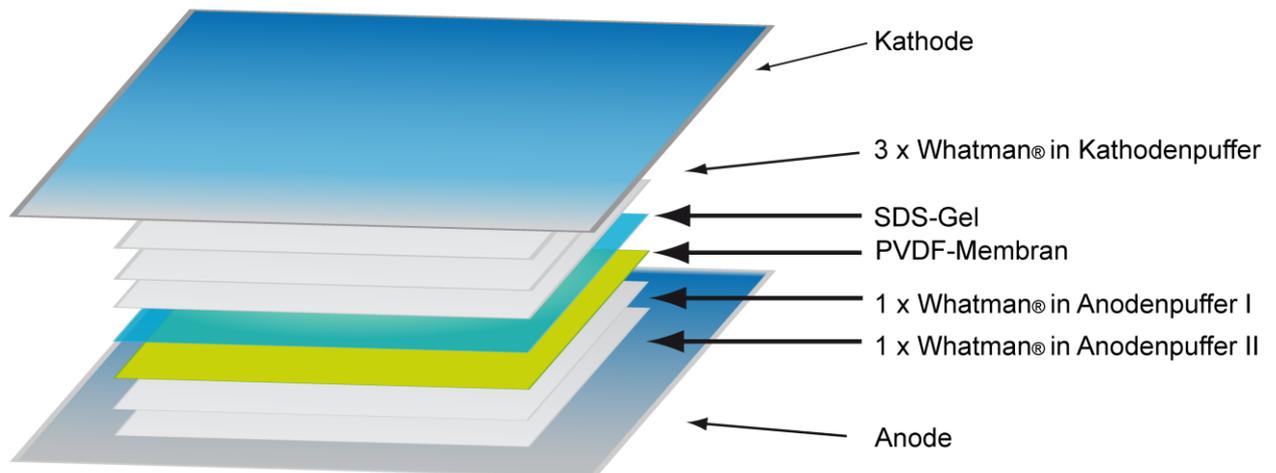
Anodenpuffer I: 300 mM Tris/HCl, pH 9,4

Anodenpuffer II: 30 mM Tris/HCl, pH 9,4

Kathodenpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 9,6, 40 mM Aminocapronsäure, 0,1 % (w/v) SDS

Blotpuffer: 48 mM Tris/HCl, 35 mM Glycin, pH 8,3

Der Elektrotransfer von Proteinen auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran ermöglicht die Zugänglichkeit der Proteine für Antikörper und erlaubt deren immunologische Detektion (siehe 4.2.4.). Die Übertragung der Proteine wird mit Hilfe eines diskontinuierlichen Puffersystems im Semi-Dry-Blotverfahren durchgeführt (siehe Abb.6). Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 2,8 mA/cm<sup>2</sup> für eine Dauer von 16–20 min.



**Abb. 6: Schematischer Aufbau des Western Blot.** Im Standardverfahren im Schichtprinzip aus equilibriertem Whatman, PVDF-Membran und SDS-Polyacrylamidgel.

### 4.2.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF Membranen

TST-Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,1 % (v/v) Tween 20

Der Nachweis der auf die PVDF-Membranen übertragenen Proteine (siehe 4.2.3.) erfolgt immunologisch mittels eines spezifischen Antikörpers. Die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran werden durch Inkubation für 30–60 min oder über Nacht bei 4°C mit 10 ml TST-Puffer abgesättigt. Anschließend erfolgt die Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper für 1 h in TST-Puffer. Nach dreimaligem Waschen

## Methoden

der Membran mit 10 ml TST wird die Membran mit dem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 30 min inkubiert. Die Detektion erfolgt nach dreimaligem Waschen unter Benutzung des Lumi-Light Blotting Substrates (Roche Applied Science, Mannheim) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Lumineszenz wird durch Exposition der Membran für 10 s bis 2 h mit einem ECL-Film dokumentiert. Alle Inkubationsschritte erfolgen, soweit nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler.

### 4.2.5 Proteinbestimmung: BCA-Assay

Die relative Proteinkonzentration einer Lösung kann über den Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) bestimmt werden. In alkalischen Lösungen reduzieren Proteine  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ , das mit BCA einen violetten Farbkomplex bildet, der quantitativ in einer photometrischen Messung nachgewiesen werden kann, da er ein Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweist (110). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration werden 10  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Lösung mit 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz versetzt und unter leichtem Schütteln für 40 min bei 37°C inkubiert. Parallel erfolgt eine Behandlung mit einem Proteinstandard (0,02–1,5 mg BSA/ml). Die Absorption bei 562 nm wird am Multiplate Reader SpectraMax 340PC gegen den entsprechenden Puffer gemessen. Die Konzentration wurde über die mit den BSA-Standards ermittelte Eichgerade berechnet. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration von Zelllysaten erfolgt am NanoDrop photometrisch.

### 4.2.6 Rekombinante Expression von Fusionsproteinen in *E. coli*

Proteine wurden stets als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* oder dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) aus *E.coli* exprimiert, da dies eine affinitätschromatische Aufreinigung (siehe 4.2.6.1, 4.2.6.2) der Proteine ermöglicht.

In den benutzten Expressionssystemen inaktiviert der Lac-Repressor in Abwesenheit von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) den *tac*-Promotor der verwendeten Expressionsplasmide. Nach Zugabe von IPTG bindet dieses an den Lac-Repressor und induziert eine Konformationsänderung des Repressors. Die dadurch induzierte Dissoziation des Repressors vom Promotor führt zur Aktivierung des Promotors und

## Methoden

resultiert in der Transkription der nachgeschalteten Gensequenzen und somit der Induktion der Expression des Fusionsproteins.

### 4.2.7 Induktion der Proteinexpression

LB-Medium: 1 % (w/v) Bacto-Trypton, 3 % (w/v) Bacto-Yeast-Extract, 86 mM NaCl

LB-Amp: LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin

LB-Amp/Kana: LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin, 25 µg/µl Kanamycin

Expressionsmedium: LB-Medium, 1 % (w/v) Glucose, 50 µg/ml Ampicillin / 25 µg/ml Kanamycin

Zunächst werden die entsprechenden Expressionskonstrukte in *E. coli* transformiert (s. 3.1.1) und eine Einzelkolonie in 50 ml Expressionsmedium als Vorkultur für 16–18 h bei 37°C kultiviert. Jeweils 20 ml der Vorkultur werden in die Hauptkultur (400 ml Expressionsmedium) überführt und bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5–1,0 bei 37°C oder 30°C kultiviert. Die Induktion erfolgt mit 0,5–1 mM IPTG für 1–2 h bei 30°C oder 37°C im Schüttler. Die Bakterien werden nach der Induktion durch Zentrifugation (6.000 × g, 15 min, bei 4°C) pelletiert, in 5 ml Lysepuffer unter Zusatz von 200 µl Complete™-EDTA Protease Inhibitor Mix resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Für die Aufreinigung von Fusionsproteinen wurde Complete™ Protease Inhibitor Mix ohne EDTA verwendet. Der Aufschluss erfolgt auf Eis durch Ultraschallbehandlung mit 3× 40 Pulsen bei einer Intensität von 40 % am Branson-Sonifier. Unlösliche Bestandteile werden danach durch Zentrifugation mit 23.400 × g bei 4°C für 45 min abgetrennt.

### 4.2.8 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen

Bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung von Fusionsproteinen wird eine Säule mit 0,8–1,2 ml Gelbett unter Verwendung des angegebenen Säulenmaterials gegossen und mit 10 ml Lysispuffer äquilibriert. Das Bakterienlysat wird auf die Säulen gegeben. Anschließend wird die Säule zweimalig mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und das gebundene Protein mit 10 ml Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wird in Fraktionen von 0,5–1,5 ml aufgefangen, jeweils 15 µl je Fraktion mit 2× SDS-Probenpuffer versetzt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.2.1) und durch Coomassie-Färbung detektiert (siehe 4.2.2). Alle Schritte der Aufreinigung werden bei 4°C durchgeführt. Die gereinigten, proteinenthaltenden Fraktionen wurden dialysiert (siehe 4.2.7).

### 4.2.9 GST- und MBP-markierte Fusionsproteine

Lysis/Wasch-Puffer:	40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0
GST-Elutionspuffer:	40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 20 mM Glutathion, pH 8,0
MBP-Elutionspuffer:	40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 20 mM Maltose, pH 8,0

Bei der Aufreinigung von GST- bzw. MBP-Fusionsproteinen wurden Glutathion-Agarose-Beads bzw. Amylose-Beads als Säulenmaterial verwendet, die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

### 4.2.10 Dialyse von Proteinlösungen

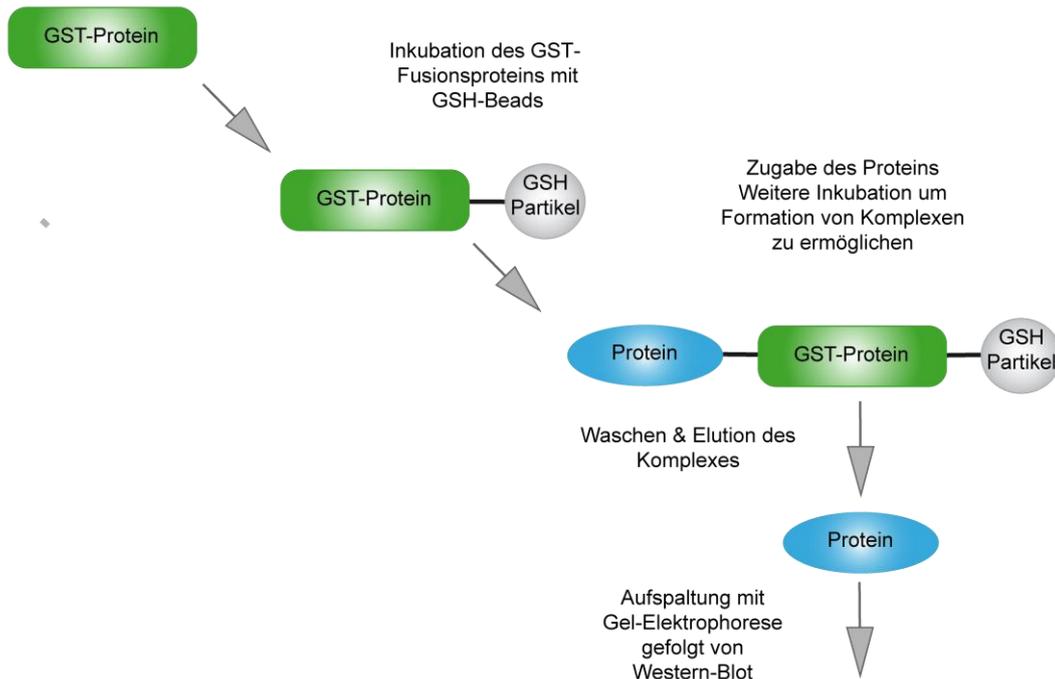
Dialyse-Puffer:	20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0
-----------------	------------------------------------

Da die für die Elution verwendeten Substanzen wie Glutathion, Maltose oder Imidazol die nachfolgenden Untersuchung beeinflussen können, wird die aus der affinitätschromatischen Aufreinigung (siehe 4.2.6) erhaltenen Proteinfractionen dialysiert. Verwendet werden Dialyseschläuche mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa. Nach Inkubation für 24 h bei 4°C wird der Dialysepuffer gewechselt und die Inkubation für weitere 24 h bei 4°C fortgesetzt.

### 4.2.11 *In vitro*-Assoziation von MBP- und GST-Fusionsproteinen (Pull-Down Assay)

Die direkte Interaktion der rekombinant erstellten Fusionsproteine lässt sich in Pull-Down-Experimenten untersuchen. Die zu untersuchenden Proteine werden gemeinsam inkubiert, um eine Assoziation zu ermöglichen. Im Ansatz enthaltene GST-Fusionsproteine können dann über Glutathion-Agarose-Beads (GSH-Beads) gebunden und durch Zentrifugation separiert werden (siehe Abb. 7). An die GST-Fusionsproteine gebundene Proteine werden damit ebenfalls abgetrennt und können anschließend über spezifische Antikörper immunologisch (siehe 4.2.1-4.2.4) nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist es möglich, durch Inkubation von rekombinant exprimierten Proteinen Interaktionspartner aus Zelllysaten zu extrahieren.

## Methoden



**Abb. 7: Schematische Darstellung eines Pull-Down-Assays.** GST-Fusionproteine werden mit GSH-Partikeln inkubiert. Nach der Entstehung des Komplexes wird das zu untersuchende Protein dazugegeben. Im Falle einer Interaktion kann das Protein von der Säule eluiert, elektrophoretisch aufgetrennt und abschließend immunologisch detektiert werden.

### 4.2.12 Interaktion von $\beta$ -Catenin mit Tip60

2x Pull-Down-Puffer: 150 mM Tris/HCl, 100 mM KCl, 300 mM Sucrose, 40 mM Imidazol, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM  $MgCl_2$ , pH 8,0

Zur Untersuchung der Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Tip60 wurden 2  $\mu$ g verschiedener GST- $\beta$ -Catenin-Deletions-Konstrukte (siehe Tab.6) und 0,25  $\mu$ l Tip60 mit 10 mM Tris, pH 8,0 auf 100  $\mu$ l aufgefüllt, mit 100  $\mu$ l 2x Pull-Down-Puffer versetzt und für 30 min bei 4°C im Überkopf-Schüttler inkubiert. Durch Zentrifugation 20.800  $\times$  g, 5 min, 4°C wird der Überstand mit 30  $\mu$ l GSH-Beads (1:2 Suspension in 1x Pull-Down-Puffer) versetzt und für eine weitere Stunde bei 4°C im Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Beads werden dreimal mit 300  $\mu$ l 1x Pull-Down-Puffer gewaschen 2.700  $\times$  g, 1 min, 4°C und abschließend mit 40  $\mu$ l 2x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 96°C erhitzt und pelletiert bei 20.800  $\times$  g, 2 min, Raumtemperatur.

Die Überstände werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 4.2.1). Der Nachweis der Proteine erfolgt mit anti-GST- und anti-MBP-Antikörpern (siehe 4.2.2-4.2.4).

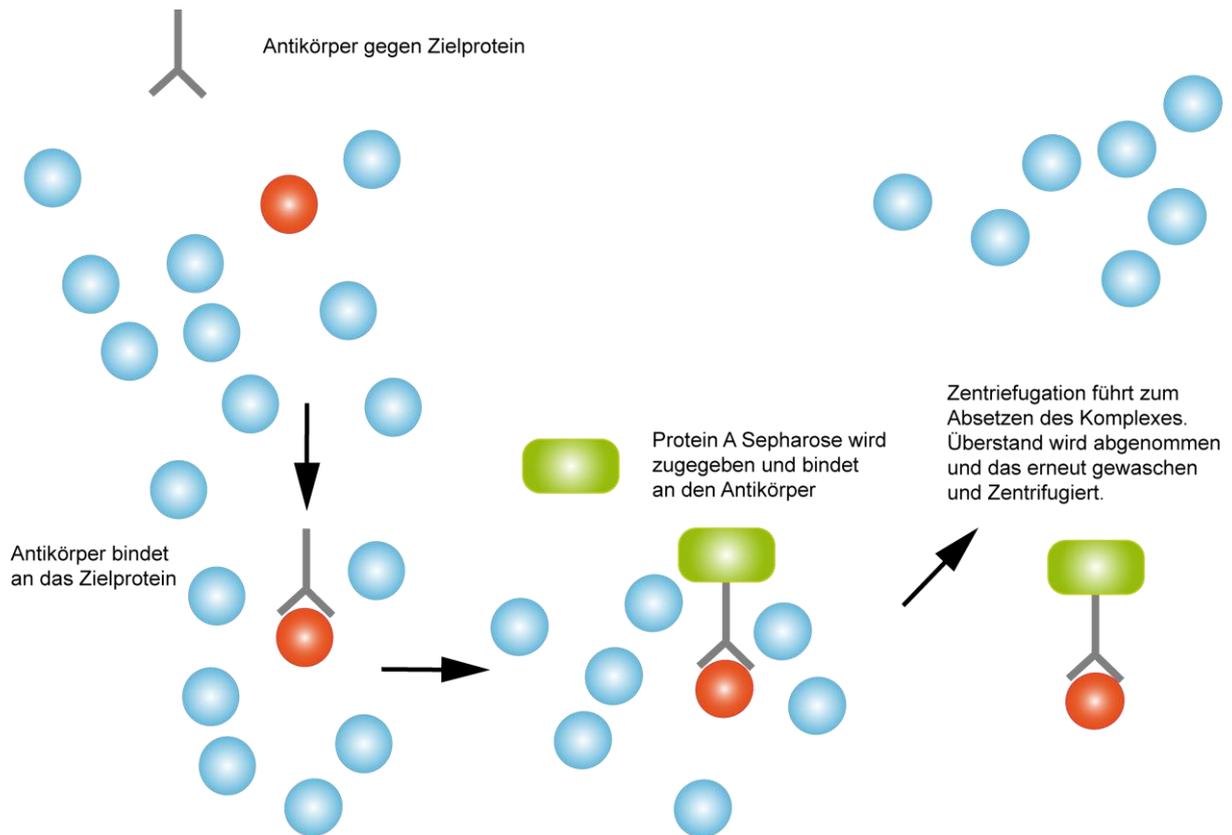
Deletionskonstrukte	Amminosäure Bereich	Tag-Sequenz
$\beta$ -Catenin	1-781	GST (N)
$\beta$ - $\Delta$ NTerm	120-781	GST (N)
$\beta$ -- $\Delta$ CTerm	1-683	GST (N)
$\beta$ -Core	120-683	GST (N)
$\beta$ -NTerm	1-119	GST (N)
$\beta$ -CTERM	683-781	GST (N)

**Tab. 6: Übersicht der verwendeten Deletionskonstrukte.** Dargestellt sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Deletionskonstrukte von  $\beta$ -Catenin (111).

### 4.3 Co-Immunpräzipitation (IP)

Die Co-Immunpräzipitation ist ein Verfahren, das dem Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen in Zelllysaten dient. Es werden vorliegende Proteinkomplexe über spezifische Antikörper isoliert (siehe Abb.8). Die enthaltenen Proteine werden dann immunologisch detektiert. In einem Ansatz wurden 200–800  $\mu$ g Gesamtprotein eines Zelllysats mit 1–2  $\mu$ g anti-FLAG-M2, anti-Myc, anti- $\beta$ -Catenin oder anti-HA Antikörper für 60 min bei 4°C im Überkopf-Schüttler inkubiert und mit 30  $\mu$ l Protein-A-Sepharose versetzt. Nach Inkubation für 30 min bei 4°C wurden die Beads zentrifugiert (2.700  $\times$  g, 4°C, 2 min) und das Pellet dreimal mit 300  $\mu$ l Lysis-Puffer (siehe 4.3.5) gewaschen. Die Beads werden mit 20  $\mu$ l 2 $\times$  SDS-Probenpuffer versetzt, und vorliegende Komplexe im Western Blot analysiert.

## Methoden



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Immunpräzipitation mit Protein-A-Sepharose.** Die Zelllysate werden mit einem Antikörper versetzt. Dieser bindet an das spezifische Zielprotein. Durch Zugabe von Protein-A-Sepharose kann der Zielprotein-Antikörper-Komplex sedimentiert und isoliert werden. Zentrifugations- und Waschschritte führen zu einer Steigerung der Reinheit des Komplexes.

### 4.3.1 Nachweis von $\beta$ -Catenin-Histonacetyltransferase-Komplexen in HEK-293-Zelllysaten

Lysis-Puffer A: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 300 mM Saccharose, 0,05 mM  $ZnCl_2$ , 0,2–1 % (v/v) Triton X-100, pH 6,8

Für den Nachweis der Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Tip60 bzw. von LEF-1 mit Tip60 wurden HEK-293-Zellen mit 2  $\mu$ g pCS2+, pCS2+ $\beta$ -Catenin-myc<sub>6</sub> und p3xFLAG-CMV14-Tip60 oder pCS2+HA-LEF sowie p3xFLAG-CMV14-Tip60 transfiziert, und die Zellen nach 48 h in Lysis-Puffer A [1 % (v/v) Triton X-100] lysiert und die Immunpräzipitation wie beschrieben mit anti-FLAG-M2 Antikörpern durchgeführt. Die Analyse erfolgt mit anti-myc, anti-HA bzw. anti-FLAG-M2 Antikörpern.

### 4.3.2 Immunpräzipitation endogener, acetylierter Proteine

Ähnlich der Co-Immunpräzipitation (siehe 4.2.13) werden mit Hilfe von spezifischen

## Methoden

Antikörpern endogene Proteine bzw. Proteinkomplexe aus Zelllysaten isoliert. Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgt mittels Western Blot. Für einen Ansatz wurden 200–800 µg Gesamtprotein des Zelllysates verwendet und mit anti-β-Catenin Antikörpern bei 4°C im Überkopfschüttler für 2 h inkubiert. Danach wurden die Proben mit 35 µl Protein-A-Sepharose versetzt und für weitere 30 min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Das weitere Vorgehen entspricht der oben genannten Vorgangsweise (siehe 4.2.9.) mit dem Unterschied, dass die Zentrifugation zwischen den Waschschritten für 5 min vorgenommen wird.

### 4.3.3 Nachweis von endogenem acetyliertem β-Catenin in HEK-293- und SW480-Zelllysaten.

Lysispuffer A: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 300 mM Saccharose, 0,05 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1–0,2 % (v/v) Triton X-100, pH 6,8

Der Nachweis von acetyliertem β-Catenin in den Zelllinien HEK-293 und SW480 erfolgt mittels Zelllysaten aus konfluent gewachsenen Kulturschalen, die mit Lysispuffer A [1% (v/v) Triton X-100] lysiert werden und danach mit anti-β-Catenin-Antikörpern inkubiert werden. Die Immunpräzipitation erfolgte wie beschrieben. Für die Immunodetektion wurde ein anti-Acetyllysine- bzw. anti-β-Catenin Antikörpern verwendet.

### 4.3.4 Kinetik in Zelllysaten nach Stimulation mit PMA

Nuclear Isolation Kit: Nuclei EZ Prep (nur Puffer für cytosolische Fraktion)  
RIPA-Puffer: 25 mM Tris/HCl, pH 6,8, 150 mM NaCl, 1,2 % (w/v) Natriumdeoxycholat, 1 % (v/v) Nonidet P40, 0,1 % (w/v) SDS, 5 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1x Complete  
Kinetik-Lysis-Puffer: 10 mM Imidazol, 0.1 M KCl, 0.3 M Sucrose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.2% (v/v), Triton X-100, complete EDTA Protease Inhibitor Cocktail, pH 6.8

Um die Auswirkungen des Phorbolesthers PMA auf LnCap-Zellen zu kontrollieren, werden die Zellen in Zellkulturschalen (Ø 10 cm) ausgesät (1 x 10<sup>6</sup>) und nach 24 h bis zu 6 h mit 20 nM PMA versetzt. Nach der entsprechenden Zeit wird das PMA-haltige Medium verworfen und die Zellen mit PBS<sup>+/+</sup> gewaschen. Nach Entfernung des PBS werden die Zellen auf Eis mit Hilfe des Lysepuffers lysiert und mit dem Zellschaber

entfernt. Pro Schale werden 200 µl des Kinetik-Lysis-Puffers verwendet. Danach erfolgt eine Zentrifugation der Lysate für  $2.700 \times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 2 min. Für die Fraktionierung der Lysate in nukleäre- und cytosolische-Anteil wurde das *Nuclear Isolation Kit Nuclei EZ Prep* nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wird jedoch anstelle des gelieferten Puffers ein RIPA-Puffer für die Resuspension der Kernfraktion verwendet. Die Aufspaltung der Lysate erfolgt mittels SDS-PAGE und die Detektion der Proteine mittels spezifischer Antikörper (siehe 4.2.1- 4.2.4).

## 4.4 Zellkultur

### 4.4.1 Kultivierung von Zellen

Zelllinien: HEK-293, LnCap, SW480  
Kulturmedium: DMEM (High Glucose), 10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Die adhärent wachsenden Zellen werden im jeweiligen Medium auf Zellkulturschalen kultiviert. Die Inkubation erfolgt in einem Begasungsbrutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit. Alle Arbeiten erfolgen unter einer sterilen Werkbank mit sterilen Materialien. Die Passage der Zellen erfolgte 1–2x pro Woche. Dazu wurden die Zellen aus einer konfluent bewachsenen Kulturschale mit 2 ml Trypsin (HEK-293-Zellen mit  $\text{PBS}^{-/-}$ , 0,05 % (v/v) EDTA) abgelöst und in einer Verdünnung von 1:2 – 1:20 neu ausgesät. Für Transfektionen wird die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellzahl ausgesät.

### 4.4.2 Einfrieren von Zellen

Gefriermedium: 10 % (v/v) DMSO, 20 % (v/v) FCS, 70 % (v/v) Medium

Einzufrierende Zellen werden mit Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst, bei  $134 \times g$  für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend werden die Zellen in 1 ml Gefriermedium resuspendiert, in Kryo-Röhrchen überführt und zunächst auf Stufe 3 für 30 min und anschließend für 10 min auf Stufe 10 in dem Einfriergerät Nicool LM10

Methoden

im Stickstoffdampf eingefroren. Die eingefrorenen Zellen verbleiben bis zum weiteren Gebrauch in einem Stickstoff-Kryotank.

### 4.4.3 Auftauen von Zellen

In Kryo-Röhrchen eingefrorene Zellen werden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, dann mit 10 ml des entsprechenden Mediums verdünnt, zentrifugiert, in 10 ml Medium resuspendiert, auf eine 10 cm Kulturschale ausgesät und bei 37°C im Brutschrank für 24 h inkubiert. Anschließend werden die Zellen 1× mit 10 ml PBS<sup>+/+</sup> gewaschen und je nach Bedarf passagiert.

### 4.4.4 Transiente Transfektion von Zellen

#### Calciumphosphat-Transfektion

2× HBS: 55 mM HEPES/NaOH, pH 7,03, 274 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

CaCl<sub>2</sub>-Lösung: 2,5 M CaCl<sub>2</sub>

Die transiente Transfektion von HEK-293-Zellen erfolgt mit Calciumphosphat, wobei die entstehenden DNA-Co-Präzipitate auf der Oberfläche der Zellen adsorbieren und von diesen endocytotisch aufgenommen werden.

Je 1 × 10<sup>6</sup> HEK-293-Zellen/well je 6-well-Platte bzw. 5 × 10<sup>6</sup> HEK-293-Zellen/10 cm Schale werden ausgesät (siehe 4.3.1) und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Für einen Transfektionsansatz wurden 200 µl H<sub>2</sub>O mit 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> und der entsprechenden DNA (maximal 4 µg/well bzw. 10 µg/Schale) versetzt und unter „vortexen“ tröpfchenweise zu 250 µl 2× HBS pipettiert. Innerhalb von 20 min Inkubation bei Raumtemperatur bilden sich feine Präzipitate und der Transfektionsansatz wird zu den Zellen gegeben. Nach 6–8-stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C wird das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS<sup>+/+</sup> gewaschen, mit frischem Medium versetzt und für weitere 42 h im Brutschrank kultiviert. Die transfizierten Zellen werden nach 48 h lysiert (siehe 4.3.5) und auf eine erfolgreiche Transfektion mittels Immundetektion (siehe 4.2.1- 4.2.4) analysiert.

#### 4.4.5 Lyse eukaryotischer Zellen

Lysis-Puffer A:	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 300 mM Saccharose, 0,05 mM ZnCl <sub>2</sub> , 0,2–1 % (v/v) Triton X-100, 1× Complete, pH 6,8
RIPA-Puffer:	25 mM Tris/HCl, pH 6,8, 150 mM NaCl, 1,2 % (m/v) Natriumdeoxycholat, 1 % (v/v) Nonidet P40, 0,1 % (m/v) SDS, 5 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub> , 1× Complete
Kinetik-Lysis-Puffer:	10 mM Imidazol, 0,1 M KCl, 0,3 M Sucrose, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 1 mM Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub> , 0.2 % (v/v) Triton X-100, Complete EDTA Protease Inhibitor Cocktail, pH 6.8

Für die Lyse der Zellen wurden konfluent bewachsene 100 mm Kulturschalen oder 6-well-Platten einmal mit eiskaltem PBS<sup>++</sup> gewaschen und anschließend mit 500 µl Lysis-Puffer/Schale bzw. 200 µl Lysis-Puffer/well für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale abgelöst und zur Entfernung unlöslicher Bestandteile mit 20.800 × g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert. Lysate, die mit RIPA-Puffer erstellt werden, wurden vor der Zentrifugation mit 0,25 U/µl Benzonase für 1–2 h bei 4°C zur Entfernung der DNA verdaut. Zusätzlich erfolgt eine Ultraschallbehandlung (4–6 Pulse; Cycle: 0,5; Amplitude: 50; UP50Ultraschallprozessor).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Interaktion von Tip60 mit LEF-1 und $\beta$ -Catenin

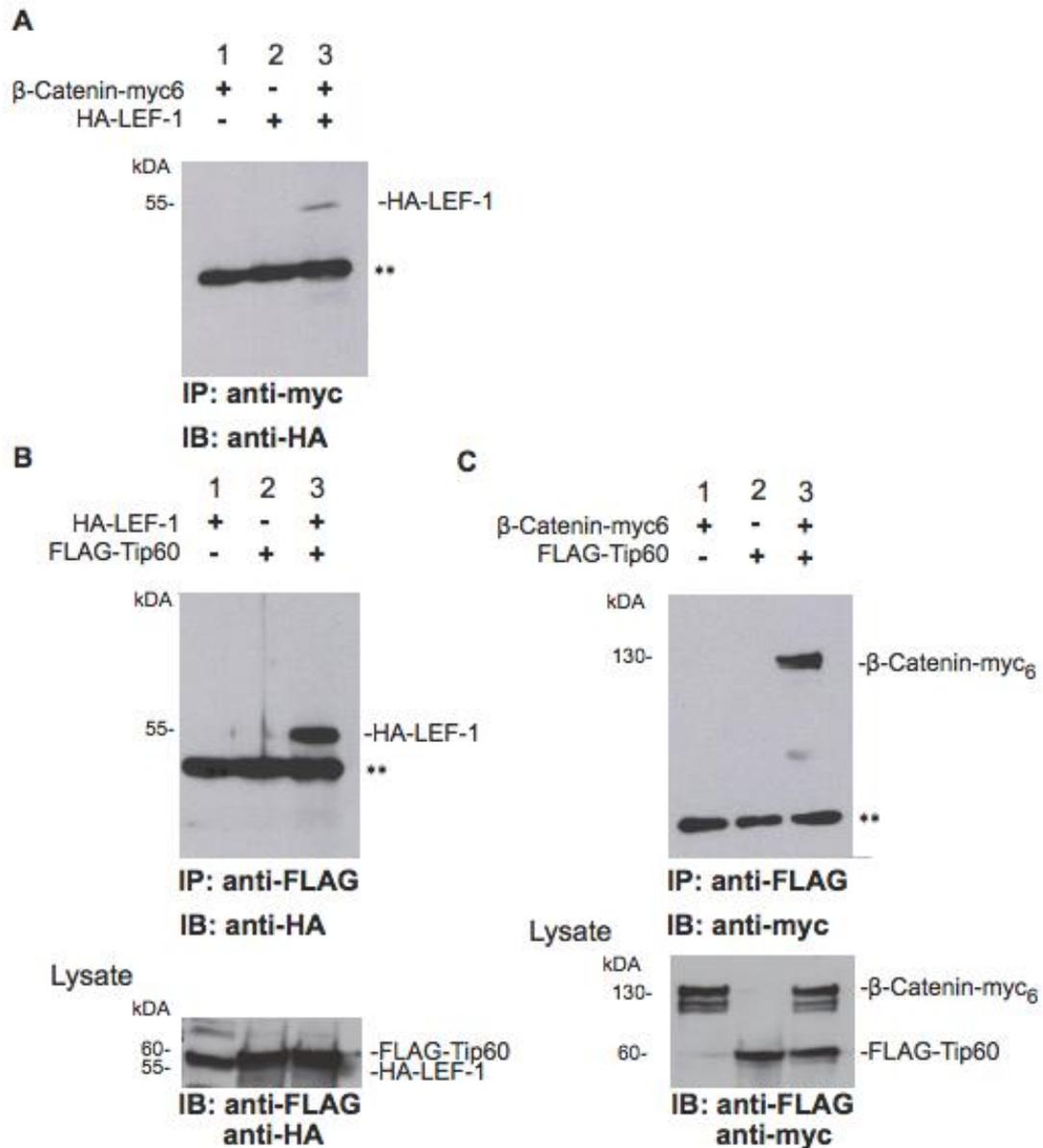
Bei LEF-1 handelt es sich um ein Mitglied aus der LEF/TCF-Familie. Diese Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die in den Wnt-Signalweg involviert ist, interagiert mit  $\beta$ -Catenin, das als Koaktivator für die Transkription von Zielgenen dient.  $\beta$ -Catenin ist ein zentraler Bestandteil des kanonischen Wnt-Signalwegs, der für die Zellentwicklung von hoher Bedeutung ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass in einer Vielzahl von Tumoren Fehlregulationen von  $\beta$ -Catenin vorliegen. Daher ist es von großem Interesse, mögliche Interaktionspartner aufzudecken, die an der Regulation von  $\beta$ -Catenin beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin posttranslational durch u.a. HATs wie CBP, p300 und PCAF acetyliert werden kann und dadurch Einfluss auf die Transkription von Zielgenen nimmt (33). Hier sollte nun untersucht werden, ob die beiden Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges,  $\beta$ -Catenin und LEF-1, mit Tip60 interagieren.

#### 5.1.1 Assoziation von Tip60 mit $\beta$ -Catenin und LEF-1 in HEK-293-Zellen

Um eine mögliche Interaktion von Tip60 mit  $\beta$ -Catenin bzw. dem LEF-1/ $\beta$ -Catenin-Komplex zu untersuchen, wurden HEK-293-Zellen mit pFLAG-CMV4-Tip60 und pCS2+ $\beta$ -Catenin-myc<sub>6</sub> bzw. pCG-HA-LEF-1 co-transfiziert. Nach der Zellyse wurde FLAG-Tip60 mit einem FLAG-Antikörper präzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Dabei ließen sich mittels Immunodetektion HA-LEF-1 (siehe Abb. 9B) bzw.  $\beta$ -Catenin-myc<sub>6</sub> (siehe Abb. 9C) mit den korrespondierenden Antikörpern nachweisen. In den Kontrollansätzen, bei denen pFLAG-CMV4-Tip60 alleine transfiziert wurde, wurden weder  $\beta$ -Catenin noch LEF-1 detektiert. Dass vergleichbare Proteinmengen überexprimiert wurden, zeigen die Lysatkontrollen (siehe Abb. 9B,C).

Aus den hier gezeigten Co-Immünpräzipitationen lässt sich schließen, dass Tip60 sowohl mit  $\beta$ -Catenin, als auch mit LEF-1 in Zellen in einem Komplex vorliegen kann.

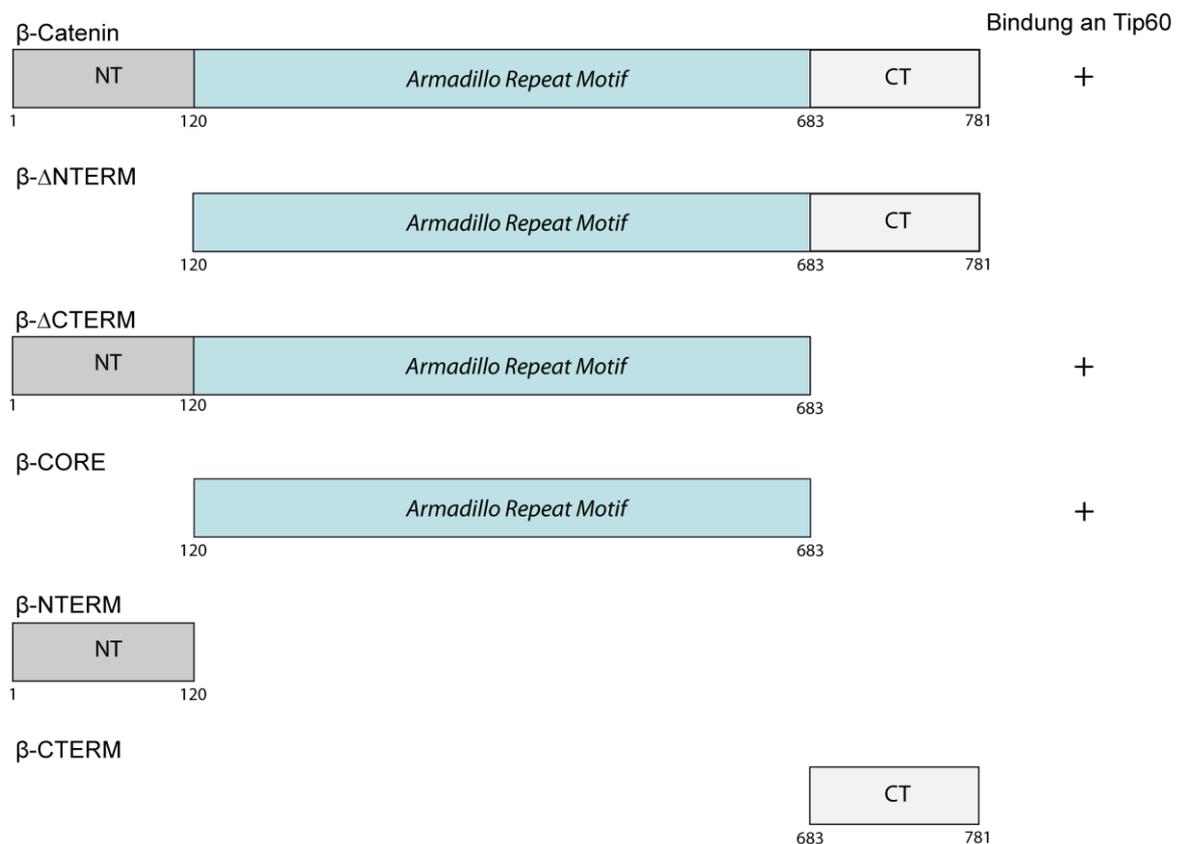
## Ergebnisse



**Abb. 9: Interaktion von Tip60 mit  $\beta$ -Catenin und LEF.** HEK-293-Zellen wurden transient mit pFLAG-CMV4-Tip60 sowie pCS2+ $\beta$ -Catenin-myc<sub>6</sub> oder pCS2+HA-LEF-1 transfiziert. Die Immunpräzipitation wurde mit einem  $\alpha$ -FLAG-M2 Antikörper bzw. IgG durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem  $\alpha$ -myc bzw.  $\alpha$ -HA Antikörper (oben). (A) Nachweis der bekannten Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF-1 (B) Co-Immunpräzipitation von FLAG-Tip60 mit HA-LEF-1 (C) Detektion der Interaktion von FLAG-Tip60 mit  $\beta$ -Catenin-myc<sub>6</sub>. \*\*schwere Kette des präzipitierenden Antikörpers.

### 5.1.2 Direkte Interaktion von $\beta$ -Catenin mit Tip60

Wie zuvor in Co-Immunopräzipitationen nachgewiesen, können die Acetyltransferase Tip60 und  $\beta$ -Catenin in Zellen assoziieren. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Proteine Teil eines größeren Proteinkomplexes sind, in dem sie nicht direkt miteinander interagieren. Ob  $\beta$ -Catenin direkt an Tip60 bindet, sollte in einem *in vitro*-Assoziationsexperiment (Pull-Down) festgestellt werden. Zusätzlich wurden Deletionskonstrukte von  $\beta$ -Catenin eingesetzt, um eine potentielle Bindungsregion des Tip60 im  $\beta$ -Catenin genauer zu verifizieren.



**Abb. 10: Schematische Darstellung der verwendeten Deletionskonstrukte von  $\beta$ -Catenin.**

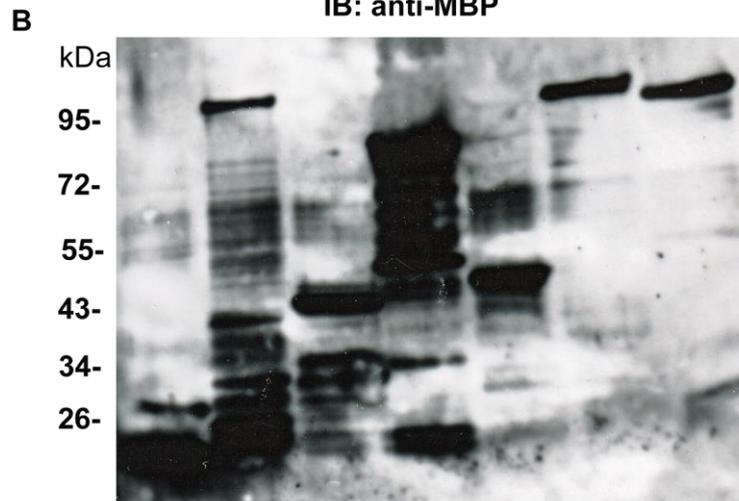
Hierzu wurden  $\beta$ -Catenin, seine N-terminale (AS 1-119), C-terminale (AS 683- 781) und Core (AS120-683) Domänen sowie zwei deletierte Konstrukte der N-terminalen bzw. der C-terminalen Domäne, (die zuvor in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-4T1 kloniert wurden) (111) als GST-Fusionsprotein exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die so gewonnenen GST-Proteine wurden mit Tip60 inkubiert, über GSH-Agarose gebunden und in SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

## Ergebnisse

<b>A</b>	1	2	3	4	5	6	7
GST	+	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Catenin	-	+	-	-	-	-	-
$\beta$ -CTERM	-	-	+	-	-	-	-
$\beta$ -CORE	-	-	-	+	-	-	-
$\beta$ -NTERM	-	-	-	-	+	-	-
$\beta$ - $\Delta$ CTERM	-	-	-	-	-	+	-
$\beta$ - $\Delta$ NTERM	-	-	-	-	-	-	+
MBP-Tip60	+	+	+	+	+	+	+



IB: anti-MBP



IB: anti-GST

**Abb. 11: Direkte Interaktion von  $\beta$ -Catenin und Tip60.** *In vitro*-Assoziationsexperimente mit rekombinant exprimierten Deletionskonstrukten von GST- $\beta$ -Catenin. Western Blot zum Nachweis der direkten Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Tip60 (A) und Input-Kontrolle (B).

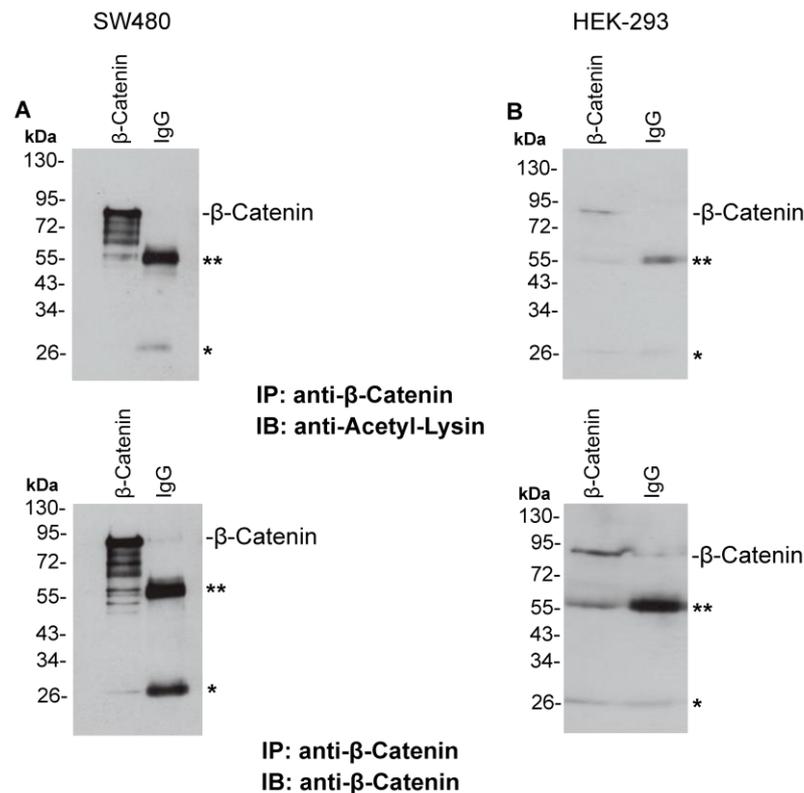
## Ergebnisse

Wie in Abb.11A exemplarisch dargestellt, konnte eine direkte Interaktion zwischen MBP-Tip60 und  $\beta$ -Catenin Volllänge (*full length*),  $\beta$ -CORE sowie  $\beta$ - $\Delta$ CTERM detektiert werden. Es konnte keine direkte Interaktion zwischen MBP-Tip60 und  $\beta$ - $\Delta$ NTERM detektiert werden, wie bei einer Bindung im CORE-Bereich zu erwarten gewesen wäre. Eine Interaktion zwischen MBP-Tip60 und GST ist nicht zu detektieren, wodurch unspezifische Interaktionen auszuschließen sind (Spalte 1). Eine schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte findet sich unter Abb.10. Die Bindungsstelle für Tip60 befindet sich demnach in der Core-Domäne (AS134-AS671) von  $\beta$ -Catenin, in dem das charakteristische Armadillo Repeat Motiv liegt. Es lässt sich vermuten, dass Tip60 ähnlich wie CBP und p300 an den C-terminalen Bereich der Armadillo-Repeat Region im  $\beta$ -Catenin bindet. Eine potentielle Acetylierungsstelle könnte jedoch auch der durch p300 acetylierte Lysin-Rest Lys345 in  $\beta$ -Catenin sein. Eine direkte Interaktion für MBP-Tip60 und GST-LEF-1 konnte nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

## 5.2 Acetylierung von $\beta$ -Catenin

Nachdem die direkte Bindung von Tip60 und  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob Tip60 einen Einfluß auf die Acetylierung von  $\beta$ -Catenin hat. Um dies zu überprüfen, sollte acetyliertes  $\beta$ -Catenin in Zelllysaten von HEK-293- und -SW480-Zellen nachgewiesen werden. Die Lysate wurden mit anti- $\beta$ -Catenin bzw. unspezifischem Maus-IgG inkubiert. Das präzipitierte  $\beta$ -Catenin wurde mit einem spezifischen anti-Acetyl-Lysin Antikörper auf eine Acetylierung untersucht. Des Weiteren wurde ein zweiter Immunpräzipitationsansatz mit anti- $\beta$ -Catenin Antikörper analysiert. In Abb. 12 ist ersichtlich, das acetyliertes  $\beta$ -Catenin in deutlichen Mengen in SW480-Zellen und in geringerer Menge in HEK-293-Zellen vorhanden ist. Dieser Unterschied lässt sich durch die unterschiedliche Konzentration von  $\beta$ -Catenin in den beiden Zelllinien erklären. SW480-Zellen tragen eine spezifische Mutation im *APC*, die mit einer verminderten Funktionalität des  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplexes und somit einer erhöhten Mengen an akkumuliertem  $\beta$ -Catenin einhergeht.

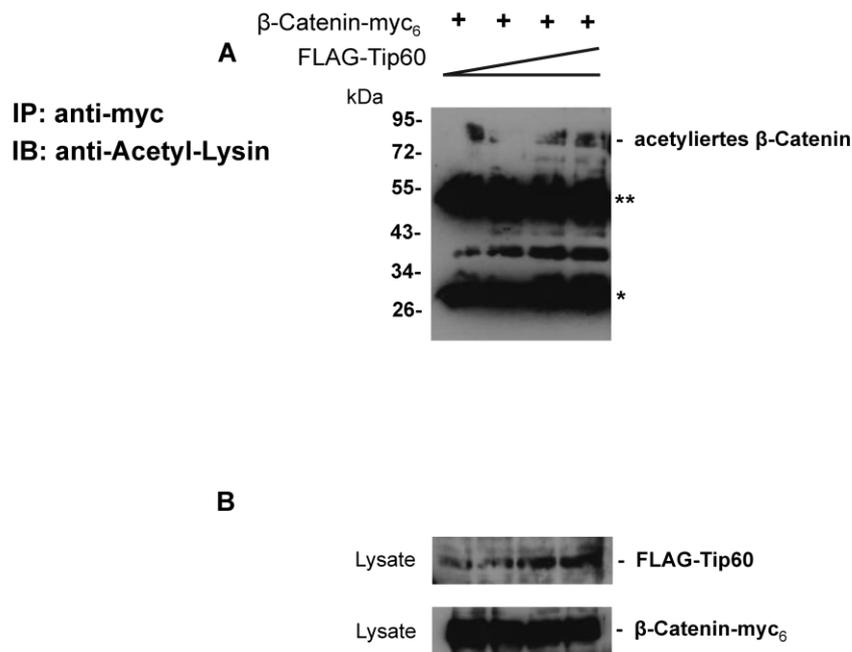
## Ergebnisse



**Abb. 11: Acetylierung von  $\beta$ -Catenin.** Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin aus SW480-Zelllysate (A) sowie HEK-2993-Zellen (B). Die Lysate wurde mit einem anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper bzw. als Kontrolle mit IgG inkubiert. Die Detektion von acetyliertem  $\beta$ -Catenin erfolgte mit einem anti-Acetyl-Lysin-Antikörper (oben). Die Kontrolle der spezifischen Präzipitation von  $\beta$ -Catenin aus den Lysaten erfolgte mit anti- $\beta$ -Catenin Antikörper (unten). \*leichte Kette und \*\*schwere Kette des präzipitierenden Antikörpers.

Um zu kontrollieren, ob Tip60 einen Einfluss auf die Menge an acetyliertem  $\beta$ -Catenin hat, wurden HEK-2993-Zellen mit konstanten Mengen an  $\beta$ -Catenin-myc<sub>6</sub> und steigenden Mengen FLAG-Tip60 transfiziert. Nach der Lyse wurde  $\beta$ -Catenin-myc<sub>6</sub> mit anti-myc Antikörper präzipitiert. Die Detektion im Immunoblot erfolgte mittels eines anti-Acetyl-Lysin Antikörpers. Die Abbildung 13A zeigt, dass acetyliertes  $\beta$ -Catenin detektiert wird, jedoch scheint die Zunahme von transfiziertem FLAG-Tip60 keinen direkt sichtbaren Einfluss auf dessen Menge zu haben.

## Ergebnisse



**Abb. 12:** Acetylierung von  $\beta$ -Catenin. A) HEK-293-Zellen wurden mit konstanten Mengen an pCS2+- $\beta$ -Catenin-myc<sub>6</sub> und ansteigenden Mengen an pCMV4-FLAG-Tip60 transfiziert. Die Immunpräzipitation wurde mit einem anti-myc-Antikörper durchgeführt. Die Detektion von acetyliertem  $\beta$ -Catenin erfolgte mit einem anti-Acetyl-Lysin-Antikörper. B) Lysatkontrolle zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion. \*leichte Kette \*\*schwere Kette des präzipitierenden Antikörpers.

### 5.3 Nukleäre Translokation / Akkumulation von Tip60 durch Phorbolester

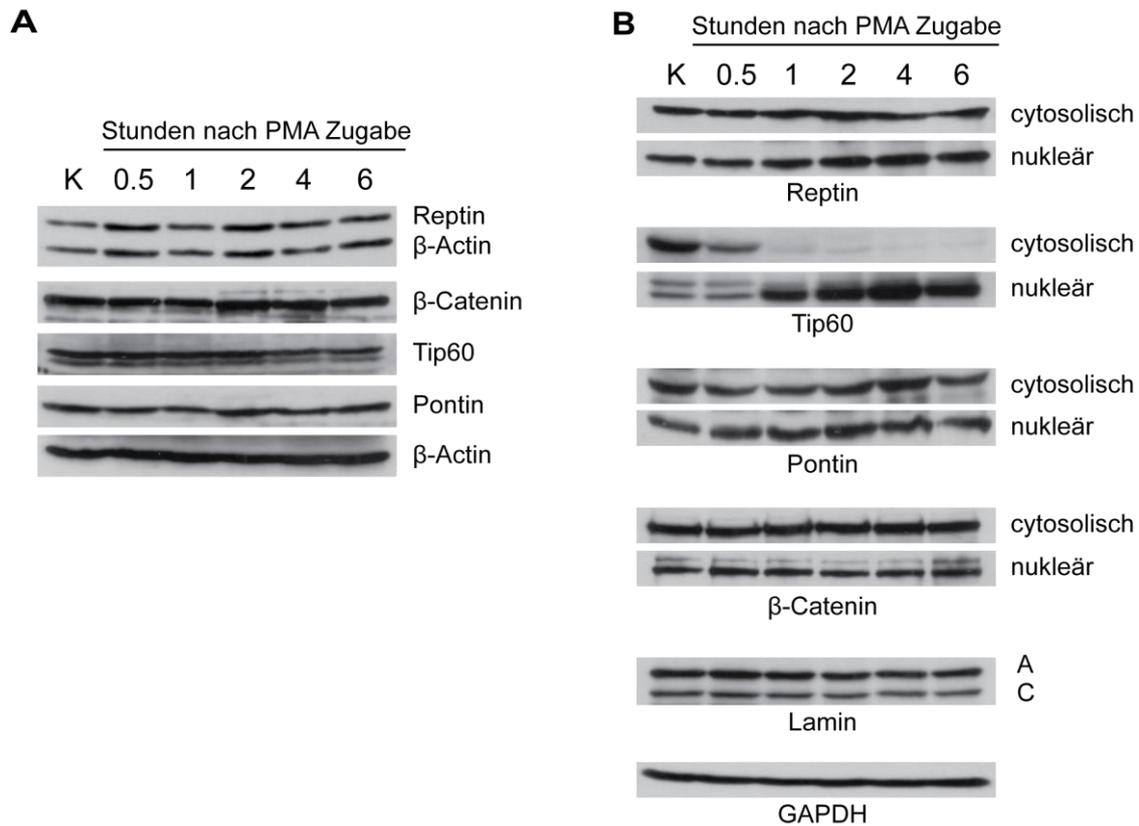
In Zellen von nicht-metastasierten Prostatakarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass eine Stimulation mit Hilfe von IL-1 $\beta$  zu einer vermehrten Detektierbarkeit eines Tip60-Komplexes im Nukleus führt. Dies führte zu einer Acetylierung von verschiedenen Histonen, wodurch die Transkription des Metastasierungssuppressors KAI1 ermöglicht wird. Hingegen konnte in einer Zelllinie eines bereits metastasierten Prostatakarzinoms dieser Nachweis des Tip60-Komplexes und die folgende Transkription von KAI1 nicht bestätigt werden. Es zeigte sich, dass ein Komplex, der  $\beta$ -Catenin beinhaltet, als Inhibitor der Transkription von KAI1 fungiert und so die Metastasierung des Tumors forciert (91, 101). Da diese gegensätzlichen Rollen von  $\beta$ -Catenin und Tip60 bekannt

## Ergebnisse

sind, sollte untersucht werden, wie man in metastasierten Zellen eine Tip60-Expression und damit eine Reexpression von KAI1 induzieren könnte. In einer Suche nach Induktoren von Tip60 in LNCaP-Zellen wurde Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA) gefunden. Bei PMA handelt es sich um einen Phorbol-ester, der genutzt wird, um Protein Kinase C (PKC) zu aktivieren, da es strukturelle Ähnlichkeiten mit dessen Aktivatoren aufweist. Jedoch ist PMA auch als tumorinduzierende Substanz bekannt. Es war daher interessant, ob es durch PMA zu einer Veränderung der relativen Menge der Proteine  $\beta$ -Catenin, Tip60, Pontin und Reptin kommen kann und ob eine Veränderung die Zusammensetzung der Proteinkomplexe, die an das p50-Protein am KAI1-Promoter binden, beeinflusst. LNCaP Zellen wurden mit 20 nM PMA für bis zu 6 h behandelt. Die Arbeitsgruppe von Prof. Jackson konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass sich die Gesamtprotein- und mRNA-Mengen für  $\beta$ -Catenin, Tip60, Pontin und Reptin im zeitlichen Verlauf nicht änderten, jedoch die KAI1 mRNA-Menge deutlich 4 h nach der Zugabe von PMA anstieg (103).

Sowohl Pontin und Reptin als auch  $\beta$ -Catenin und Tip60 sind Proteine deren Lokalisation im Cytoplasma und im Nukleus nachgewiesen werden konnten. Jedoch sind nur die im Nukleus befindlichen Anteile für die Transkription von Bedeutung. Da PMA keine Veränderung der Gesamtproteinexpression hervorgerufen hat, lässt sich der beobachtete Effekt auf KAI1 eventuell mit einer veränderten intrazellulären Verteilung einer oder mehrerer der genannten Proteine erklären. Besonders Pontin und Tip60 sind hier denkbar, da sie als Aktivatoren von KAI1 fungieren. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden erneut LNCaP Zellen mit PMA stimuliert. An festgelegten Zeitpunkten wurden dann nukleäre und cytosolische Fraktionen der genannten Proteine mittels Immunodetektion untersucht.

## Ergebnisse



**Abb. 13: Western Blot Analyse der Zell-Lysate.** LNCaP-Zellen wurden von 0 bis zu 6 h mit DMSO bzw. 20 nM PMA in DMSO behandelt. **A)** Die Gesamtproteinmengen von Tip60, β-Catenin, Pontin, Reptin und β-Actin waren gleichbleibend und zeigten keine Veränderung nach PMA-Gabe **B)** Eine Analyse des Verteilungsmusters durch Fraktionierung in Cytosol und Nukleus zeigte hingegen eine Abnahme der Menge an Tip60 im Cytosol bereits 30 min nach Zugabe von PMA und der Zunahme von Tip60 in der nukleären Fraktion. Die Kontrolle der eingesetzten Proteinmenge erfolgte mit Hilfe von anti-Lamin A/C und anti-GAPDH-Antikörpern.

Im Falle von Tip60 zeigt sich interessanterweise, dass es zunächst im Cytosol detektierbar ist, allerdings die Signalstärke über die Zeit abnimmt. Bereits eine Stunde nach Stimulation mit PMA ist Tip60 im Cytosol nicht mehr zu detektieren. Jedoch kommt es mit einer geringen zeitlichen Verzögerung zu einem konstanten Anstieg des Signals von Tip60 in der nukleären Fraktion über den Verlauf der nächsten 5 Stunden. Im Falle von β-Catenin, Pontin oder Reptin konnte über den Zeitraum keine nennenswerte Veränderung der Verteilung beobachtet werden (siehe Abb.13).

## 6 Diskussion

$\beta$ -Catenin ist ein zentraler Bestandteil des kanonischen Wnt-Signalwegs und ein Onkogen von großer Bedeutung für die Entwicklung und Interaktion von verschiedenen Zellen sowie die Entstehung von Tumorerkrankungen. Es konnten bis heute eine Vielzahl von Interaktionspartnern identifiziert und charakterisiert werden, die die Regulation von  $\beta$ -Catenin direkt und indirekt beeinflussen.

Weit weniger intensiv wurden Moleküle untersucht, die  $\beta$ -Catenin posttranslational modifizieren und somit Einfluss auf dessen verschiedenen Funktionen nehmen. Bisher konnten eine Vielzahl an Bedeutungen von HATs für essentielle physiologische und pathophysiologische Abläufe in Zellen beschrieben werden. Bekannt war bereits, dass  $\beta$ -Catenin durch bestimmte HATs acetyliert werden kann und so dessen Stabilität, als auch die Transkription von Zielgenen unterschiedlich beeinflusst wird. Interessanterweise konnte man anhand von androgensensiblen, metastasierten Prostatakarzinomzellen nachweisen, dass  $\beta$ -Catenin in einem Repressorkomplex mit Reptin die Transkription des Metastasierungssuppressorgens KAI1 supprimiert, während durch die HAT Tip60 im Komplex mit der DNA-Helikase Pontin die Transkription aktiviert wird (65).

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, ob Tip60 einen potentiellen Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin darstellt, potentielle Einflüsse auf dessen Acetylierungen zu verifizieren und die Auswirkungen auf die Regulation des Metastasierungssuppressors KAI1 zu beschreiben.

### 6.1 $\beta$ -Catenin interagiert mit der HAT Tip60

Aus vorangehenden Untersuchungen ist bekannt, dass HATs mögliche Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin (33, 34) und Mitgliedern der TCF/LEF-Familie sind, die diese zum einen acetylieren können (112), zum anderen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität nehmen (113). Es ist bekannt, dass die reversible Acetylierung von  $\beta$ -Catenin direkten, positiven Einfluss auf dessen Stabilität nach Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs hat (33) sowie direkt die Bindungsaffinität von  $\beta$ -Catenin

## Diskussion

an TCF/LEF und damit die Effektivität des Transkriptionskomplexes positiv beeinflusst (33, 34). Da sowohl mit der HAT PCAF, sowie den HATs CBP/p300 gezeigt werden konnte, dass sie mit  $\beta$ -Catenin und LEF-1 interagieren und diese acetylieren (114), wurde zunächst untersucht, ob die HAT Tip60 ebenfalls als Interaktionspartner von humanem  $\beta$ -Catenin und LEF-1 fungieren kann. In Untersuchungen mit FLAG-markiertem Tip60 sowie  $\beta$ -Catenin-myc<sub>6</sub> und HA-LEF-1 konnte eine Interaktion von  $\beta$ -Catenin und Tip60, sowie eine Interaktion zwischen LEF-1 und Tip60 mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationsexperimenten in HEK-293-Zellen nachgewiesen werden. Aus der Tatsache, dass  $\beta$ -Catenin einen Transkriptionskomplex mit LEF-1 bildet (115) und dieses sich in unserem Versuch bestätigt, lässt sich schließen, dass es sich bei den nachgewiesenen Interaktionen von Tip60 mit  $\beta$ -Catenin und LEF-1 um eine relevante Interaktion handelt. Die Bildung eines trimären Komplexes aus den genannten Bestandteilen wäre vereinbar mit der Annahme eines funktionellen Komplexes aus  $\beta$ -Catenin, TCF/LEF und HAT, bei dem es der Bindung von  $\beta$ -Catenin an TCF/LEF bedarf, um TCF/LEF als Substrat für HATs nutzen zu können (114).

Zur Kontrolle dieser Ergebnisse wurden Pull-Down-Analysen mit rekombinanten GST- $\beta$ -Catenin-Varianten, GST-LEF-1 und MBP-Tip60 durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass es sich bei der Assoziation von  $\beta$ -Catenin und Tip60 um eine direkte Interaktion handelt. Die Bindestelle von Tip60 konnte auf den Core-Bereich (AS:134-671) von  $\beta$ -Catenin eingegrenzt werden. Um eine genauere Lokalisation der Bindung aufzuzeigen, wäre es nötig, zunächst die Domäne gemäß ihres *Armadillo-Repeat-Motifs* (ARM) zu unterteilen und rekombinant zu exprimieren, um dann mit Hilfe von Pull-Down-Experimenten ein detailliertes *Mapping* vorzunehmen. Danach könnten die in Betracht kommenden Bindungsstellen durch Mutagenese alteriert werden, um die fehlende Bindung von Tip60 an die Core-Domäne von  $\beta$ -Catenin nachzuweisen.

In der Vergangenheit beschriebene Acetylierungsstellen sind innerhalb des  $\beta$ -Catenins, sowohl in der Core-Domäne von  $\beta$ -Catenin als auch im proximalen Bereich der N-terminalen Domäne zu finden. Spezifisch für die Acetylierung von  $\beta$ -Catenin durch HATs sind die N-Terminal gelegenen Acetylierungsstellen (Lys49) sowie im Armadillo-Repeat 6 (Lys345) beschrieben worden. Die beschriebene Acetylierung von  $\beta$ -Catenin durch CBP/p300 erfolgt am Lys345 (33).

Eine direkte Interaktion zwischen LEF-1 und Tip60 konnte in diesem Versuch nicht gezeigt werden. Der Grund dafür könnte in der Notwendigkeit der Anwesenheit des Interaktionspartners  $\beta$ -Catenin liegen, da dieses bereits für die Interaktion mit HATs wie CBP mit der TCF/LEF-Familie gezeigt wurde (34, 113). Um diese Annahme zu bestätigen, wäre es nötig, die direkte Interaktion der drei Komponenten in einem weiteren Pull-down Assay zu verifizieren

Aufgrund bekannter Acetylierung von  $\beta$ -Catenin durch verschiedene HATs an der Core-Domäne war anzunehmen, dass auch die HAT Tip60 in der posttranslationalen Modifikation von  $\beta$ -Catenin partizipiert.

## **6.2 Tip60 beeinflusst die Acetylierung von $\beta$ -Catenin nicht**

Auf Grund vorbeschriebener Acetylierung von  $\beta$ -Catenin durch verschiedene HATs an der Core-Domäne sollte untersucht werden, ob die HAT Tip60 in der Lage ist,  $\beta$ -Catenin posttranslational zu acetylieren.

Um zunächst zu prüfen, ob  $\beta$ -Catenin sich in acetylierter Form darstellen lässt, wurde in verschiedenen humanen Zelllinien versucht, acetyliertes  $\beta$ -Catenin mit Hilfe von anti- $\beta$ -Catenin Antikörper aus den Zelllysaten zu präzipitieren und mittels eines Acetyl-Lysin-Antikörpers nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass in Zelllinien wie SW480, die eine große Menge  $\beta$ -Catenin beinhalten, proportional auch eine größere Menge an acetyliertem  $\beta$ -Catenin zu detektieren ist. In Zellen, die auf Grund eines nicht aktivierten Wnt-Signalwegs über geringere Mengen  $\beta$ -Catenin verfügen, wie HEK-293-Zellen, findet sich eine entsprechend geringere Menge an gesamtem  $\beta$ -Catenin, sowie dessen acetylierten Anteils. Dies lässt sich zum einen mit der vorliegenden Menge des Proteins in den Lysaten erklären, zum anderen jedoch auch mit einer erhöhten Stabilität von  $\beta$ -Catenin, welche mit Hilfe der Acetylierung durch bestimmte HATs bereits beobachtet werden konnte (116). Denn in einem Großteil kolorektaler Tumoren konnte neben den Mutationen im APC-kodierenden Gen, welche zu einer verminderten Funktionalität des  $\beta$ -Catenin-Destruktionskomplexes führen, auch der positive Einfluss der Acetylierung auf Stabilität (116) sowie nukleäre Translokation von  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden.

## Diskussion

Zusätzlich konnte eine erhöhte Bindung von acetyliertem  $\beta$ -Catenin an Mitglieder der TCF-Familie beschrieben werden, aus der die vermehrte Transkription der Wnt-Zielgene resultiert (34). Eine klinische Bedeutung von  $\beta$ -Catenin bei der Entstehung und der Progression von Prostatatumoren konnte bisher von der benignen Prostatahyperplasie (117) bis zu metastasierten Tumoren nachgewiesen werden (118).

Es sollte gezeigt werden, dass Tip60 wie andere HATs einen Einfluss auf den Acetylierungsgrad von  $\beta$ -Catenin hat. Zunächst wurde versucht SW480-Zellen mit Tip60 zu transfizieren, um danach mit anti- $\beta$ -Catenin-Antikörpern  $\beta$ -Catenin zu präzipitieren und in acetylierter-Form durch Immunoblot zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Dieses gelang jedoch mit verschiedenen Transfektionsmethoden nur unzureichend. Aus diesem Grund wurden HEK-293-Zellen für die Transfektion von  $\beta$ -Catenin und Tip60 verwendet. Es gelang mit Hilfe der IP, acetyliertes  $\beta$ -Catenin nachzuweisen, jedoch zeigte sich kein veränderter Acetylierungsgrad bei erhöhten Mengen von transfiziertem Tip60. Einerseits könnte dies methodisch bedingt sein und an der Schwierigkeit liegen, quantitative Unterschiede des präzipitierten Proteins vorzunehmen. Andererseits könnte das verwendete System eine zu artifizielle Umgebung für einen solchen komplexen Vorgang darstellen, der *in vivo* nur in äußerst geringen Mengen abläuft und somit die geringste verwendete Menge schon die Acetylierungsstellen sättigt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Tip60 eine antagonistische Wirkung gegenüber der beschriebenen HAT-Aktivität auf  $\beta$ -Catenin hat (119).

Trotz intensiver Versuche gelang es leider nicht, einen Einfluss von Tip60 auf die Aktivität der gut beschriebenen Effektoren des Wnt-Signalwegs, Siamois S0/S5 bzw. Topflash/Fopflash Promotoren mittels *Reporter-Gen-Assay-Experimenten* nachzuweisen. Es bedarf weiterer Untersuchungen ob Tip60 alleine regulatorischen Einfluss auf die  $\beta$ -Catenin/LEF-1-vermittelte Transkription hat oder ob es eines weiteren Partners bedarf. Das *Fragile Histidine Triad Protein* (Fhit), ein Mitglied der HIT (Histidin-Triaden)-Proteinfamilie, interagiert direkt mit Tip60 (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Fhit kann die Aktivität von  $\beta$ -Catenin im Nukleus beeinflussen und  $\beta$ -Catenin/LEF-1-medierte Transkription inhibieren.

Unsere Daten unterstützen die Beobachtungen, dass Tip60 als Tumorsuppressor fungieren kann (120) und dies nicht nur indirekt (121), sondern direkten Einfluss auf die Entstehung von kolorektalen Tumoren (122) durch repressive Maßnahmen im

aktivierten Wnt-Signalweg hat (65, 119). Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass bei niedriger Konzentration von Tip60 auf Grund von heterozygotem Knockdown die direkt Wnt-abhängige TCF/LEF-Transkription deutlich erhöht war. Bei Tip60-depletierten Zellen, konnte bei unveränderten Mengen  $\beta$ -Catenin-spezifischer mRNA, eine erhöhte Expression von  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden. Dies weist auf einen posttranskriptionellen Einfluss von Tip60 hin, der die Stabilisierung und Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Cytosol negativ beeinflussen kann. Zusätzlich fand sich in diesen Zellen eine höhere Menge an acetyliertem  $\beta$ -Catenin. Diese Beobachtung ermöglicht die Annahme, dass Tip60 antagonistisch der Acetylierung von Lys345 von  $\beta$ -Catenin durch CBP/p300 gegenüber steht und somit die Stabilität und Transkriptionsaktivität von  $\beta$ -Catenin negativ reguliert (119). Unsere Beobachtungen können diese Ergebnisse insofern unterstützen und erweitern, dass  $\beta$ -Catenin und Tip60 direkte Interaktionspartner sind, jedoch keine posttranskriptionelle Modifikation im Sinne der reversiblen Acetylierung stattfindet. Somit ist eine tumorsuppressive Wirkung von Tip60 nicht nur auf den DSB-Repair-Mechanismus und Induktion von Apoptose beschränkt (123, 124), sondern vor allem durch die durch Hemmung des Wnt-Signalwegs, dem zentralen Signaltransduktionsweg bei der Entstehung von Kolonkarzinomen und Prostatakarzinomen als Möglichkeit zu betrachten, die durch Ergebnisse aus klinischen Untersuchungsmaterialien unterstützt wird (122).

### **6.3 Nukleäre Translokation von Tip60 durch Phorbolster**

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass  $\beta$ -Catenin und Tip60 einen antagonistischen Effekt auf die Regulation der Transkription des Metastasierungssuppressors KAI1 in Prostatakarzinomzellen haben. Es wurde gezeigt, dass es in metastasierten Tumorzellen der Prostata nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  zur Bildung eines Aktivator-Komplexes bestehend aus Tip60 und Pontin kommt. Bei Fehlen von IL-1 $\beta$  kam es hingegen zur Verdrängung des Aktivator-Komplexes durch einen Repressorkomplex, der aus  $\beta$ -Catenin und Reptin besteht (104). Daher war es von großem Interesse für uns, zu untersuchen, welche Faktoren einen regulatorischen Einfluss auf die Transkription von KAI1 haben.

## Diskussion

Der Phorbolester PMA induziert sowohl in LNCaP, als auch in anderen Prostatakarzinomzelllinien suppressive Effekte auf die Tumorzellproliferation und induziert Apoptose. Dieses geschieht über die Freisetzung von *Death- und Trail-factors* über verschiedene Signaltransduktionswege wie p38/JNK, TNFalpha(125) als auch PKC (126). PMA aktiviert jedoch auch PKC-vermittelt die Transkription von KAI1 in LNCaP (103). Dies erklärt sich wahrscheinlich durch die Bindung eines Aktivatorkomplexes bestehend aus Pontin/Tip60 an das p50-Protein am KAI1-Promoters (103). Anzunehmen war, dass durch die Stimulation mit PMA veränderte Konzentrationen der beteiligten Proteine zur Entstehung einer favorisierten Umgebung führen. Die Untersuchung der Zellysate nach Stimulation von LNCaP-Zellen mit PMA zeigte jedoch keine veränderten Gesamtproteinmengen der an den Regulationskomplexen maßgeblich beteiligten Proteine  $\beta$ -Catenin, Tip60, Pontin bzw. Reptin. Aus diesem Grund scheint die Regulation mittels veränderter Expression als Mechanismus unwahrscheinlich.

Da die Proteine sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus nachgewiesen werden können, untersuchten wir, ob es zu veränderten Konzentrationen nach Stimulation mit PMA innerhalb des Cytoplasmas bzw. Nukleus kommt, wodurch die Transkription beeinflusst werden könnte. In der Fraktionierung der stimulierten Zellysate konnte gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg von Tip60 in der nukleären Fraktion binnen 30 Minuten nach dem Beginn der Stimulation kommt, während die entsprechende cytosolische Konzentration abnimmt. Diese Translokation hält für den gesamten Zeitraum unter Stimulation mit PMA an. Die weiteren Proteine zeigten keine Veränderung der Konzentration im jeweiligen Kompartiment. Eine mögliche Erklärung ist, dass die konzentrierte nukleäre Lokalisation von Tip60 eine konzentrationsabhängige favorisierte Bindung an Pontin und dann die Bildung des Aktivatorkomplexes am KAI1-Promoter ermöglicht. Dieser Zustand könnte mit der nachgewiesenen gesteigerten Transkription von KAI1 nach Stimulation mit PMA assoziiert sein. Ob die Translokation von Tip60 direkt durch die aktivierte PKC bedingt erfolgt oder andere Faktoren beteiligt sind, bleibt zu erörtern. Das Histidin-Triad-Protein Hint-1 ist PKC-abhängig und ist in der Lage, Pontin aus dem gelösten Pontin/Reptin-Komplex direkt zu binden (127). Hint1 ist zudem ein Bestandteil des Tip60 Histonacetyltransferase-Komplexes (128). Es wäre denkbar, dass die Aktivierung von PKC durch die Stimulierung mit PMA in LNCaP-Zellen zur nukleären Translokation von

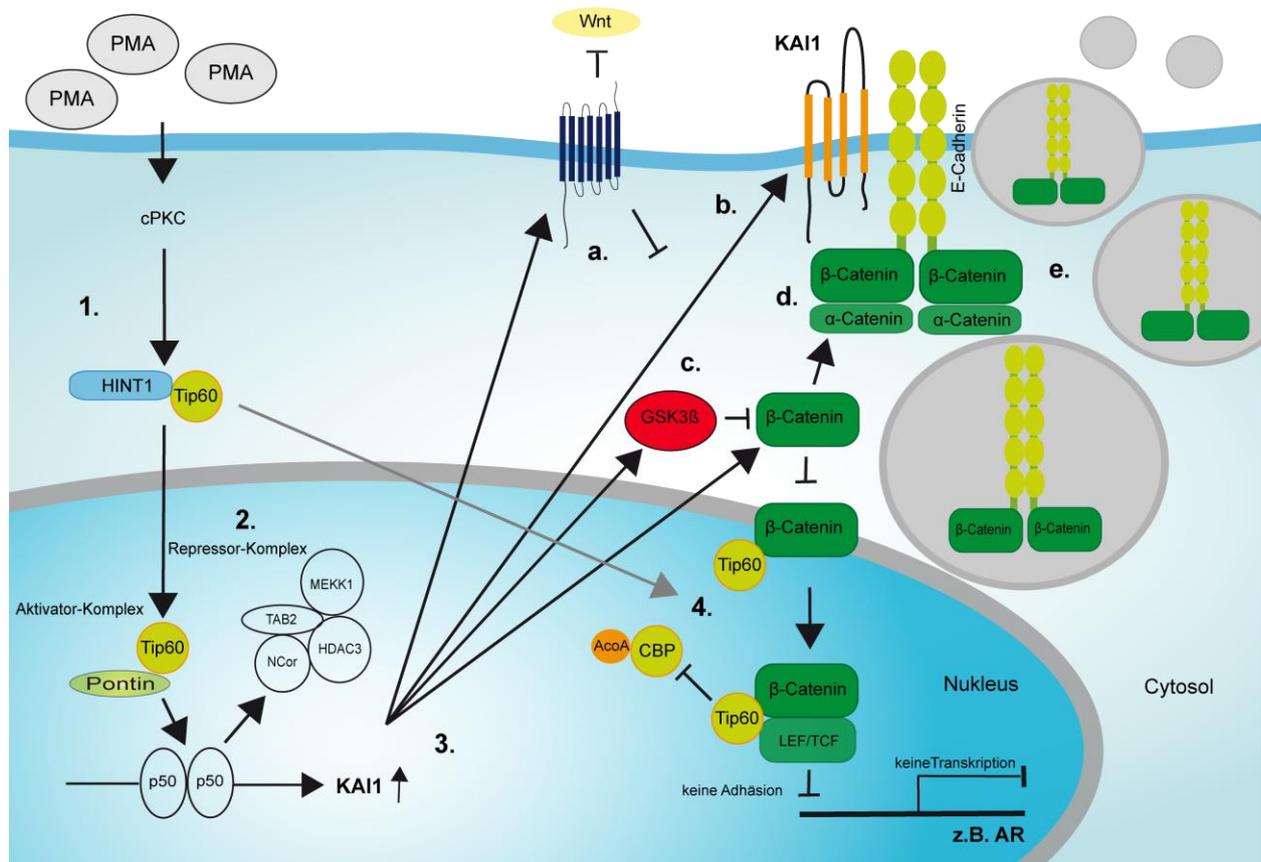
## Diskussion

Tip60 durch Hint1 führt (siehe Abb.16 Punkt 1) und Hint1 die Bildung des Aktivator-Komplexes Pontin/Tip60 beeinflusst. (siehe Abb.16 Punkt 2).

Der Einfluss, den KAI1 auf die Metastasierung von Tumoren hat, ist vielschichtig. Deshalb wird an dieser Stelle nur auf den Einfluss von KAI1 auf die Regulation des kanonischen Wnt-Signalwegs eingegangen. Die Wnt-Fzd-Interaktion ist von großer Bedeutung in der Tumorenstehung und -progression (129). Es besteht ein signifikanter Einfluss von KAI1 auf die Expression der Fzd-Rezeptoren 2,3,7 und 9, die für die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs und folglich für die Akkumulation und nukleäre Translokation von  $\beta$ -Catenin von Bedeutung sind (130) (siehe Abb.16 Punkt 3a). KAI1 ist zusätzlich in der Lage, die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin auf verschiedene Weisen zu verhindern und somit die Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Cytosol zu ermöglichen (130, 131). Das cytosolische  $\beta$ -Catenin kann dann gebunden an E-Cadherin an der Zellmembran nachgewiesen werden, wo es zur Integrität und Stabilisierung des interzellulären Verbandes beiträgt (130). Einige Tetraspanine wie KAI1 sind in hoher Konzentration in Exosomen enthalten. Diese Exosomen sind in der Lage  $\beta$ -Catenin aktiv aus der Zelle zu entfernen (siehe Abb.16 Punkt 3e), sofern es als Komplex gebunden an E-Cadherin vorliegt (132).

Auch Hint1 nimmt durch die Bindung an Pontin Einfluss auf die TCF/ $\beta$ -Catenin-vermittelte Transkription und inhibiert diese in SW480-Kolonkarzinomzellen (127). Ob dieses in Zusammenhang mit der Bindung von Tip60 an  $\beta$ -Catenin steht oder unabhängig erfolgt, bleibt Ziel weiterer Untersuchungen (siehe Abb.16 Punkt 4). In der folgenden Abbildung sind die diskutierten Aspekte schematisch dargestellt.

## Diskussion



**Abb. 14: Übersicht des Einflusses von Tip60 und KAI1 auf β-Catenin.** 1) Stimulation von LNCaP-Zelle mit Phorbolster (PMA) bewirkt die Aktivierung von cPKC und vermittelt die Translokation von Tip60 in den Nucleus. 2) Der Pontin/Tip60 Aktivator-Komplex bindet an das am Promoter gebundene p50-Protein 3) Der Aktivator-Komplex aktiviert die Transkription von KAI1 a. KAI1 reduziert die Expression von bestimmten Fzd-Rezeptoren b. KAI1 ist ein in Exosomen enthaltenes Tetraspanin c. reduzierte Phosphorylierung von β-Catenin d. cytosolisches β-Catenin bindet an E-Cadherin und stabilisiert den Zellverbund e. Endosomenbildung und exosomale Entfernung von β-Catenin aus der Zelle 4. β-Catenin und Tip60 interagieren direkt miteinander und bilden einen trimären Komplex mit LEF. Tip60 wirkt antagonistisch auf die HAT-vermittelte Acetylierung.

## 7 Zusammenfassung

Der kanonische Wnt-Signalweg und dessen zentraler Bestandteil  $\beta$ -Catenin haben eine entscheidende Rolle in der Embryogenese, Zellintegrität sowie in der Entstehung und Progression einer Vielzahl von Tumorerkrankungen wie dem Prostatakarzinom. Das Tetraspanin KAI1 agiert in Prostatakarzinomzellen als Metastasierungssuppressor. Durch die Bindung eines  $\beta$ -Catenin-haltigen Repressorkomplexes wird dessen Transkription in LNCaP-Zellen reduziert oder durch einen Tip60-haltigen Aktivorkomplex induziert. Daher ging es in dieser Arbeit darum, das Verhältnis der Histonacetyltransferase Tip60 zu  $\beta$ -Catenin zu untersuchen.

Der Phorbolester PMA, der tumorfördernde Eigenschaften besitzt, führt in androgen-sensitiven metastasierten Prostatatumorzellen zu einer gesteigerten Transkription von KAI1 durch die Bindung des Tip60-haltigen Aktivorkomplexes. Die Stimulation führt zu keiner Veränderung der Mengen an nachgewiesenen Proteinen des Aktivator bzw. des Repressorkomplexes. Es kommt hingegen zu einer Translokation von Tip60 aus dem Cytosol in den Nukleus. Diese Beobachtung ermöglicht die Annahme, dass durch veränderte intranukleäre Konzentration von Tip60 die Bildung und Bindung des Aktivorkomplexes an das NF $\kappa$ B-p50-Protein von KAI1 favorisiert wird und Tip60 in diesem Kontext als Tumorsuppressor agieren könnte.

Bestimmte Histonacetyltransferasen interagieren mit dem Onkoprotein  $\beta$ -Catenin, stabilisieren es durch Acetylierung und steigern somit die Transkription von Wnt-Zielgenen durch verbesserte Bindung von  $\beta$ -Catenin und dessen Transkriptionspartner der TCF/LEF-Familie an die Zielgene. Auch die Histonacetyltransferase Tip60 bindet sowohl im Core-Bereich von  $\beta$ -Catenin, als auch an dessen Interaktionspartner LEF-1.

Ein Einfluss von Tip60 auf die Acetylierung von  $\beta$ -Catenin konnte nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Tip60 eine restriktive Bedeutung für die Regulation des kanonischen Wnt-Signalweges hat, in dem es den Transkriptionskomplex zwischen  $\beta$ -Catenin und LEF-1 hemmt.

Vermehrtes Verständnis der multifaktoriellen Einflüsse von Tip60 und  $\beta$ -Catenin auf die regulatorischen Abläufe in Prostatakarzinomen könnten helfen neue Ansatzpunkte für Diagnostik und Therapie zu identifizieren.

## 8 Literatur

1. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: A common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286-3305.
2. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303:1483-1487.
3. Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YK, Varmus H. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 1984;307:131-136.
4. Luo J CJ, Deng ZL, Luo X, Song WX, Sharff KA, Tang N, Haydon RC, Luu HH, & TC H. Wnt signaling and human diseases: What are the therapeutic implications? *Lab Invest* 2007 87:97-103.
5. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and apc compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 1994;127:2061-2069.
6. McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B. A homolog of the armadillo protein in drosophila (plakoglobin) associated with e-cadherin. *Science* 1991;254:1359-1361.
7. Luu HH, Zhang R, Haydon RC, Rayburn E, Kang Q, Si W, Park JK, Wang H, Peng Y, Jiang W, et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway as a novel cancer drug target. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:653-671.
8. Hamada F, Murata Y, Nishida A, Fujita F, Tomoyasu Y, Nakamura M, Toyoshima K, Tabata T, Ueno N, Akiyama T. Identification and characterization of e-apc, a novel drosophila homologue of the tumour suppressor apc. *Genes Cells* 1999;4:465-474.
9. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 2007;22:303-309.
10. Salic A, Lee E, Mayer L, Kirschner MW. Control of beta-catenin stability: Reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in xenopus egg extracts. *Mol Cell* 2000;5:523-532.
11. Jin T, George Fantus I, Sun J. Wnt and beyond wnt: Multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal* 2008;20:1697-1704.
12. Gavert N, Ben-Ze'ev A. Beta-catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 2007;102:820-828.
13. Reddien PW. Constitutive gene expression and the specification of tissue identity in adult planarian biology. *Trends Genet* 2011;27:277-285.
14. Wang Y, van der Zee M, Fodde R, Blok LJ. Wnt/beta-catenin and sex hormone signaling in endometrial homeostasis and cancer. *Oncotarget* 2010;1:674-684.
15. Agholme F, Aspenberg P. Wnt signaling and orthopedics, an overview. *Acta Orthop*;82:125-130.

## Literatur

16. Jeong JW, Lee HS, Franco HL, Broaddus RR, Taketo MM, Tsai SY, Lydon JP, DeMayo FJ. Beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. *Oncogene* 2009;28:31-40.
17. Armstrong DD, Wong VL, Esser KA. Expression of beta-catenin is necessary for physiological growth of adult skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C185-188.
18. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, Kharode Y, Sauter L, Babij P, Brown EL, et al. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem* 2006;281:31720-31728.
19. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:387-398.
20. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. Wnt and beta-catenin signalling: Diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 2004;5:691-701.
21. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843-850.
22. Moon RT, Kimelman D. From cortical rotation to organizer gene expression: Toward a molecular explanation of axis specification in xenopus. *Bioessays* 1998;20:536-545.
23. Saldanha G, Ghura V, Potter L, Fletcher A. Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *Br J Dermatol* 2004;151:157-164.
24. Saif MW, Chu E. Biology of colorectal cancer. *Cancer J* 2011;16:196-201.
25. Doucas H, Garcea G, Neal CP, Manson MM, Berry DP. Changes in the wnt signalling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance. *Eur J Cancer* 2005;41:365-379.
26. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to wnt signaling. *Cell* 2000;103:311-320.
27. Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 2000;287:1606-1609.
28. Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki CY, Longo DL, Lim B, Sun Z. Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *J Biol Chem* 2002;277:11336-11344.
29. Mulholland DJ, Read JT, Rennie PS, Cox ME, Nelson CC. Functional localization and competition between the androgen receptor and t-cell factor for nuclear beta-catenin: A means for inhibition of the tcf signaling axis. *Oncogene* 2003;22:5602-5613.
30. Yu X, Wang Y, DeGraff DJ, Wills ML, Matusik RJ. Wnt/beta-catenin activation promotes prostate tumor progression in a mouse model. *Oncogene* 2011;30:1868-1879.

## Literatur

31. Cho HJ, Kim JK, Kim KD, Yoon HK, Cho MY, Park YP, Jeon JH, Lee ES, Byun SS, Lim HM, et al. Upregulation of bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Lett* 2006;237:56-66.
32. Kim JH, Kim B, Cai L, Choi HJ, Ohgi KA, Tran C, Chen C, Chung CH, Huber O, Rose DW, et al. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by tip60 and  $\beta$ -catenin complexes. *Nature* 2005;434:921-926.
33. Wolf D, Rodova M, Miska EA, Calvet JP, Kouzarides T. Acetylation of beta-catenin by creb-binding protein (cbp). *J Biol Chem* 2002;277:25562-25567.
34. Levy L, Wei Y, Labalette C, Wu Y, Renard CA, Buendia MA, Neuveut C. Acetylation of beta-catenin by p300 regulates beta-catenin-tcf4 interaction. *Mol Cell Biol* 2004;24:3404-3414.
35. Hino S, Tanji C, Nakayama KI, Kikuchi A. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic amp-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol Cell Biol* 2005;25:9063-9072.
36. Wang J, Liu N, Liu Z, Li Y, Song C, Yuan H, Li YY, Zhao X, Lu H. The orphan nuclear receptor rev-erbbeta recruits tip60 and hdac1 to regulate apolipoprotein ciii promoter. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:224-236.
37. Kamine J, Elangovan B, Subramanian T, Coleman D, Chinnadurai G. Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the hiv-1 tat transactivator. *Virology* 1996;216:357-366.
38. Sapountzi V, Cote J. Myst-family histone acetyltransferases: Beyond chromatin. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:1147-1156.
39. Neuwald AF, Landsman D. Gcn5-related histone n-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast spt10 protein. *Trends in Biochemical Sciences* 1997;22:154-155.
40. Utley RT, Cote J. The myst family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003;274:203-236.
41. Legube G, Linares LK, Lemercier C, Scheffner M, Khochbin S, Trouche D. Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by mdm2 and accumulates after uv irradiation. *EMBO J* 2002;21:1704-1712.
42. Hejna J, Holtorf M, Hines J, Mathewson L, Hemphill A, Al-Dhalimy M, Olson SB, Moses RE. Tip60 is required for DNA interstrand cross-link repair in the fanconi anemia pathway. *J Biol Chem* 2008;283:9844-9851.
43. Sheridan AM, Force T, Yoon HJ, O'Leary E, Choukroun G, Taheri MR, Bonventre JV. Plip, a novel splice variant of tip60, interacts with group iv cytosolic phospholipase a(2), induces apoptosis, and potentiates prostaglandin production. *Mol Cell Biol* 2001;21:4470-4481.

## Literatur

44. Hlubek F, Lohberg C, Meiler J, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Tip60 is a cell-type-specific transcriptional regulator. *J Biochem* 2001;129:635-641.
45. Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, Amati B. Myc recruits the tip60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* 2003;4:575-580.
46. Gaughan L, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN. Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem* 2002;277:25904-25913.
47. Shiota M, Yokomizo A, Masubuchi D, Tada Y, Inokuchi J, Eto M, Uchiumi T, Fujimoto N, Naito S. Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus. *Prostate* 2010;70:540-554.
48. Kranz D, Dohmesen C, Dobbstein M. Brca1 and tip60 determine the cellular response to ultraviolet irradiation through distinct pathways. *J Cell Biol* 2008;182:197-213.
49. Sapountzi V, Logan IR, Robson CN. Cellular functions of tip60. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1496-1509.
50. Legube G, Trouche D. Identification of a larger form of the histone acetyltransferase tip60. *Gene* 2003;310:161-168.
51. Akhtar A Fau - Zink D, Zink D Fau - Becker PB, Becker PB. Chromodomains are protein-rna interaction modules. 2000.
52. Yan Y Fau - Barlev NA, Barlev Na Fau - Haley RH, Haley Rh Fau - Berger SL, Berger Sl Fau - Marmorstein R, Marmorstein R. Crystal structure of yeast esa1 suggests a unified mechanism for catalysis and substrate binding by histone acetyltransferases. 2000.
53. Nordentoft I, Jorgensen P. The acetyltransferase 60 kda trans-acting regulatory protein of hiv type 1-interacting protein (tip60) interacts with the translocation e26 transforming-specific leukaemia gene (tel) and functions as a transcriptional co-repressor. *Biochem J* 2003;374:165-173.
54. Xiao H, Chung J, Kao HY, Yang YC. Tip60 is a co-repressor for stat3. *J Biol Chem* 2003;278:11197-11204.
55. Gaughan L, Brady ME, Cook S, Neal DE, Robson CN. Tip60 is a co-activator specific for class i nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* 2001;276:46841-46848.
56. Dohmesen C, Koepfel M, Dobbstein M. Specific inhibition of mdm2-mediated neddylation by tip60. *Cell Cycle* 2008;7:222-231.
57. Lemercier C, Legube G, Caron C, Louwagie M, Garin J, Trouche D, Khochbin S. Tip60 acetyltransferase activity is controlled by phosphorylation. *J Biol Chem* 2003;278:4713-4718.

## Literatur

58. Col E, Caron C, Chable-Bessia C, Legube G, Gazzeri S, Komatsu Y, Yoshida M, Benkirane M, Trouche D, Khochbin S. Hiv-1 tat targets tip60 to impair the apoptotic cell response to genotoxic stresses. *EMBO J* 2005;24:2634-2645.
59. Cheng Z, Ke Y, Ding X, Wang F, Wang H, Wang W, Ahmed K, Liu Z, Xu Y, Aikhionbare F, et al. Functional characterization of tip60 sumoylation in uv-irradiated DNA damage response. *Oncogene* 2008;27:931-941.
60. Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD. A role for the tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of atm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13182-13187.
61. Tyteca S, Vandromme M, Legube G, Chevillard-Briet M, Trouche D. Tip60 and p400 are both required for uv-induced apoptosis but play antagonistic roles in cell cycle progression. *EMBO J* 2006;25:1680-1689.
62. Taubert S, Gorrini C, Frank SR, Parisi T, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, Amati B. E2f-dependent histone acetylation and recruitment of the tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late g1. *Mol Cell Biol* 2004;24:4546-4556.
63. Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 2006;24:827-839.
64. Kim SY, Kim MY, Mo JS, Park HS. Notch1 intracellular domain suppresses app intracellular domain-tip60-fe65 complex mediated signaling through physical interaction. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:736-746.
65. Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG. Exchange of n-cor corepressor and tip60 coactivator complexes links gene expression by nf-kappab and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 2002;110:55-67.
66. Miranti CK. Controlling cell surface dynamics and signaling: How cd82/kai1 suppresses metastasis. *Cell Signal* 2009;21:196-211.
67. Hemler ME. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 2001;155:1103-1107.
68. Liu WM, Zhang XA. Kai1/cd82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett* 2006;240:183-194.
69. Kalanon M, Tonkin CJ, McFadden GI. Characterization of two putative protein translocation components in the apicoplast of plasmodium falciparum. *Eukaryot Cell* 2009;8:1146-1154.
70. Kolesnikova TV, Mannion BA, Berditchevski F, Hemler ME. Beta1 integrins show specific association with cd98 protein in low density membranes. *BMC Biochem* 2001;2:10.
71. Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: Molecular facilitators. *FASEB J* 1997;11:428-442.

## Literatur

72. Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:397-422.
73. Lee JH, Seo YW, Park SR, Kim YJ, Kim KK. Expression of a splice variant of kai1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res* 2003;63:7247-7255.
74. Rana S, Claas C, Kretz CC, Nazarenko I, Zoeller M. Activation-induced internalization differs for the tetraspanins cd9 and tspan8: Impact on tumor cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;43:106-119.
75. Wright MD, Tomlinson MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* 1994;15:588-594.
76. Levy S, Shoham T. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:218-224.
77. Ono M, Handa K, Withers DA, Hakomori S. Glycosylation effect on membrane domain (gem) involved in cell adhesion and motility: A preliminary note on functional alpha3, alpha5-cd82 glycosylation complex in Ild1 14 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:744-750.
78. Masciopinto F, Campagnoli S, Abrignani S, Uematsu Y, Pileri P. The small extracellular loop of cd81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative hcv receptor. *Virus Res* 2001;80:1-10.
79. Charrin S, le Naour F, Silvie O, Milhiet PE, Boucheix C, Rubinstein E. Lateral organization of membrane proteins: Tetraspanins spin their web. *Biochem J* 2009;420:133-154.
80. Senes A, Ubarretxena-Belandia I, Engelman DM. The calpha ---h...O hydrogen bond: A determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9056-9061.
81. Bienstock RJ, Barrett JC. Kai1, a prostate metastasis suppressor: Prediction of solvated structure and interactions with binding partners; integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Mol Carcinog* 2001;32:139-153.
82. Zhou B, Liu L, Reddivari M, Zhang XA. The palmitoylation of metastasis suppressor kai1/cd82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity. *Cancer Res* 2004;64:7455-7463.
83. You J, Madigan MC, Rowe A, Sajinovic M, Russell PJ, Jackson P. An inverse relationship between kai1 expression, invasive ability, and mmp-2 expression and activity in bladder cancer cell lines. *Urol Oncol* 2012.
84. Yu Y, Yang JL, Markovic B, Jackson P, Yardley G, Barrett J, Russell PJ. Loss of kai1 messenger rna expression in both high-grade and invasive human bladder cancers. *Clin Cancer Res* 1997;3:1045-1049.

## Literatur

85. Takaoka A, Hinoda Y, Satoh S, Adachi Y, Itoh F, Adachi M, Imai K. Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor kai1 gene. *Oncogene* 1998;16:1443-1453.
86. Malik FA, Sanders AJ, Kayani MA, Jiang WG. Effect of expressional alteration of kai1 on breast cancer cell growth, adhesion, migration and invasion. *Cancer Genomics Proteomics* 2009;6:205-213.
87. Yang JL, Jackson P, Yu Y, Russell PJ, Markovic B, Crowe PJ. Expression of the kai1 metastasis suppressor gene in non-metastatic versus metastatic human colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3337-3342.
88. Jackson P, Kingsley EA, Russell PJ. Inverse correlation between kai1 mrna levels and invasive behaviour in bladder cancer cell lines. *Cancer Lett* 2000;156:9-17.
89. Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME. Overexpression of kai1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:5284-5288.
90. Tagawa K, Arihiro K, Takeshima Y, Hiyama E, Yamasaki M, Inai K. Down-regulation of kai1 messenger rna expression is not associated with loss of heterozygosity of the kai1 gene region in lung adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:970-976.
91. Dong JT, Suzuki H, Pin SS, Bova GS, Schalken JA, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT. Down-regulation of the kai1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res* 1996;56:4387-4390.
92. Kawana Y, Komiya A, Ueda T, Nihei N, Kuramochi H, Suzuki H, Yatani R, Imai T, Dong JT, Yoshie O, et al. Location of kai1 on the short arm of human chromosome 11 and frequency of allelic loss in advanced human prostate cancer. *Prostate* 1997;32:205-213.
93. Miyazaki T, Kato H, Shitara Y, Yoshikawa M, Tajima K, Masuda N, Shouji H, Tsukada K, Nakajima T, Kuwano H. Mutation and expression of the metastasis suppressor gene kai1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2000;89:955-962.
94. Jackson P, Millar D, Kingsley E, Yardley G, Ow K, Clark S, Russell PJ. Methylation of a cpg island within the promoter region of the kai1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of kai1 expression in invasive cancers or cancer cell lines. *Cancer Lett* 2000;157:169-176.
95. Kim MS, Merlo X, Wilson C, Lough J. Co-activation of atrial natriuretic factor promoter by tip60 and serum response factor. *J Biol Chem* 2006;281:15082-15089.
96. Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase c (pkc) and link pkc to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem* 2001;276:25005-25013.

## Literatur

97. Parsons M, Keppler MD, Kline A, Messent A, Humphries MJ, Gilchrist R, Hart IR, Quittau-Prevostel C, Hughes WE, Parker PJ, et al. Site-directed perturbation of protein kinase c- integrin interaction blocks carcinoma cell chemotaxis. *Mol Cell Biol* 2002;22:5897-5911.
98. Marreiros A, Dudgeon K, Dao V, Grimm MO, Czolij R, Crossley M, Jackson P. Kai1 promoter activity is dependent on p53, junb and ap2: Evidence for a possible mechanism underlying loss of kai1 expression in cancer cells. *Oncogene* 2005;24:637-649.
99. Telese F, Bruni P, Donizetti A, Gianni D, D'Ambrosio C, Scaloni A, Zambrano N, Rosenfeld MG, Russo T. Transcription regulation by the adaptor protein fe65 and the nucleosome assembly factor set. *EMBO Rep* 2005;6:77-82.
100. Shinohara T, Miki T, Nishimura N, Nokihara H, Hamada H, Mukaida N, Sone S. Nuclear factor-kappab-dependent expression of metastasis suppressor kai1/cd82 gene in lung cancer cell lines expressing mutant p53. *Cancer Res* 2001;61:673-678.
101. Liu L, Wu DH, Li ZG, Yang GZ, Ding YQ. Effects of kai1/cd82 on biological behavior of human colorectal carcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 2003;9:1231-1236.
102. Cao X, Sudhof TC. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of app with fe65 and histone acetyltransferase tip60. *Science* 2001;293:115-120.
103. Rowe A, Weiske J, Kramer TS, Huber O, Jackson P. Phorbol ester enhances kai1 transcription by recruiting tip60/pontin complexes. *Neoplasia* 2008;10:1421-1432, following 1432.
104. Kim JH, Kim B, Cai L, Choi HJ, Ohgi KA, Tran C, Chen C, Chung CH, Huber O, Rose DW, et al. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by tip60 and beta-catenin complexes. *Nature* 2005;434:921-926.
105. Tozawa K, Akita H, Kawai N, Okamura T, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Kai1 expression can be a predictor of stage a prostate cancer progression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2001;4:150-153.
106. Akita H, Iizuka A, Hashimoto Y, Kohri K, Ikeda K, Nakanishi M. Induction of kai-1 expression in metastatic cancer cells by phorbol esters. *Cancer Lett* 2000;153:79-83.
107. Jackson P, Ow K, Yardley G, Delprado W, Quinn DI, Yang JL, Russell PJ. Downregulation of kai1 mRNA in localised prostate cancer and its bony metastases does not correlate with p53 overexpression. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2003;6:174-181.
108. Hanahan D. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 1983;166:557-580.
109. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 1970;227:680-685.

## Literatur

110. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
111. Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R, Hoschuetzky H. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 1994;107 ( Pt 12):3655-3663.
112. Waltzer L, Bienz M. Drosophila cbp represses the transcription factor tcf to antagonize wingless signalling. *Nature* 1998;395:521-525.
113. Li J, Sutter C, Parker DS, Blauwkamp T, Fang M, Cadigan KM. Cbp/p300 are bimodal regulators of wnt signaling. *EMBO J* 2007;26:2284-2294.
114. Elfert S, Weise A, Bruser K, Biniossek ML, Jagle S, Senghaas N, Hecht A. Acetylation of human tcf4 (tcf7l2) proteins attenuates inhibition by the hbp1 repressor and induces a conformational change in the tcf4::DNA complex. *PLoS One* 2013;8:e61867.
115. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor lef-1. *Nature* 1996;382:638-642.
116. Ge X, Jin Q, Zhang F, Yan T, Zhai Q. Pcaf acetylates {beta}-catenin and improves its stability. *Mol Biol Cell* 2009;20:419-427.
117. Bauman TM VC, Huang W, Marker PC, Peterson RE, Ricke WA. Beta-catenin is elevated in human benign prostatic hyperplasia specimens compared to histologically normal prostate tissue. *Am J Clin Exp Urol* 2014;2:313-322.
118. Jung SJ, Oh S, Lee GT, Chung J, Min K, Yoon J, Kim W, Ryu DS, Kim IY, Kang DI. Clinical significance of wnt/beta-catenin signalling and androgen receptor expression in prostate cancer. *World J Mens Health*;31:36-46.
119. Chevillard-Briet M, Quaranta M, Grezy A, Mattera L, Courilleau C, Philippe M, Mercier P, Corpet D, Lough J, Ueda T, et al. Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through wnt signaling. *Hum Mol Genet* 2014;23:2120-2131.
120. Gorrini C, Squatrito M, Luise C, Syed N, Perna D, Wark L, Martinato F, Sardella D, Verrecchia A, Bennett S, et al. Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature* 2007;448:1063-1067.
121. Mattera L, Escaffit F, Pillaire MJ, Selves J, Tyteca S, Hoffmann JS, Gourraud PA, Chevillard-Briet M, Cazaux C, Trouche D. The p400/tip60 ratio is critical for colorectal cancer cell proliferation through DNA damage response pathways. *Oncogene* 2009;28:1506-1517.
122. Sakuraba K, Yasuda T, Sakata M, Kitamura YH, Shirahata A, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, et al. Down-regulation of tip60 gene as a potential marker for the malignancy of colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009;29:3953-3955.

## Literatur

123. Fischle W. Tip60-ing the balance in dsb repair. *Nat Cell Biol* 2009;11:1279-1281.
124. Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, Scully R, Qin J, Nakatani Y. Involvement of the tip60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 2000;102:463-473.
125. Gonzalez-Guerrico AM, Meshki J, Xiao L, Benavides F, Conti CJ, Kazanietz MG. Molecular mechanisms of protein kinase c-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J Biochem Mol Biol* 2005;38:639-645.
126. Xiao L, Gonzalez-Guerrico A, Kazanietz MG. Pkc-mediated secretion of death factors in Incap prostate cancer cells is regulated by androgens. *Mol Carcinog* 2009;48:187-195.
127. Weiske J, Huber O. The histidine triad protein hint1 interacts with pontin and reptin and inhibits tcf-beta-catenin-mediated transcription. *J Cell Sci* 2005;118:3117-3129.
128. Weiske J, Huber O. The histidine triad protein hint1 triggers apoptosis independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem* 2006;281:27356-27366.
129. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837-1851.
130. Chigita S, Sugiura T, Abe M, Kobayashi Y, Shimoda M, Onoda M, Shirasuna K. Cd82 inhibits canonical wnt signalling by controlling the cellular distribution of beta-catenin in carcinoma cells. *Int J Oncol*;41:2021-2028.
131. Abe M, Sugiura T, Takahashi M, Ishii K, Shimoda M, Shirasuna K. A novel function of cd82/kai-1 on e-cadherin-mediated homophilic cellular adhesion of cancer cells. *Cancer Lett* 2008;266:163-170.
132. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of beta-catenin: A novel mechanism that antagonizes wnt signaling. *J Cell Biol* 2010;190:1079-1091.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Tobias Kramer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Identifikation der Histon-Acetyl-Transferase Tip60 als Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin und Regulationsmechanismen von KAI1 in der Onkogenese und Tumorprogression selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den Uniform Requirements for Manuscripts (URM) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, den \_\_ . \_\_ . \_\_

Tobias Kramer

## **Anteilerklärung an erfolgten Publikationen**

Herr Tobias Kramer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation: A. Rowe, J. Weiske, T.S. Kramer, O. Huber, P. Jackson  
Phorbol Ester Enhances KAI1 Transcription by Recruiting Tip60/Pontin Complexes  
Neoplasia 2008, Volume 10 Number 12.1421– 1432

Beitrag im Einzelnen: Herr Tobias Kramer plante, führte durch, kontrollierte und interpretierte die Experimente, die in den Abbildungen 5b & 5c der Publikation zu sehen sind.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Tobias Kramer

## **10 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11 Publikationsliste

Aus dieser Promotionsarbeit ist folgende Publikation hervorgegangen:

A. Rowe\*, J. Weiske\*, T.S. Kramer, O. Huber, P. Jackson

Phorbol Ester Enhances KAI1 Transcription by Recruiting Tip60/Pontin Complexes

Neoplasia 2008, Volume 10 Number 12.1421– 1432

\*Diese Autoren haben zu gleichen Anteilen an dieser Arbeit partizipiert

Berlin, den \_\_ . \_\_ . \_\_

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Otmar Huber für die Bereitstellung des interessanten und vielschichtigen Themas, für die langjährige fachliche Betreuung sowie für die zahlreichen Ideen zur Bewältigung diverser Probleme bedanken. Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Tauber für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut unter hervorragenden wissenschaftlichen Bedingungen anzufertigen. Des Weiteren danke ich den Gutachtern für ihren Einsatz.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und des Instituts gilt mein Dank für das freundschaftliche Arbeitsklima im Labor. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Barbara „Luise“ Kosel für ihre Hilfestellung und praktischen Anleitung. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Jörg Weiske für die Inspiration und den kritischen Diskurs. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Sebastian Riese und Frau Dr. Sonnhild Mittag für die fortwährende Unterstützung und ihre kritischen Anmerkungen bedanken. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Kai Albring für wissenschaftliche Diskussionen und die Unterstützung bei praktischen Problemen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Laura Hinderer und meiner Familie, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.